

Untersuchungen zu Umweltrisikobewertungen
von Humanpharmaka und
Inhaltsstoffen von Körperpflegeprodukten
vor dem Hintergrund europäischer Bewertungskonzepte

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Markus Liebig
aus Darmstadt

Frankfurt 2005

vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Oehlmann
PD. Dr. Thomas A. Ternes

Datum der Disputation: 17. Mai 2005

Dank

Danke an meinen Doktorvater Prof. Jörg Oehlmann und den zweiten Gutachter Dr. Thomas Ternes.

Besonderen Dank an Thomas Knacker, meinen Betreuer bei der ECT Oekotoxikologie GmbH in Flörsheim, wo die Durchführung der praktischen Arbeiten und die Ausarbeitung der Dissertation stattfanden.

Danke an meinen Kollegen und Lehrer Philipp Egeler, und an alle Kollegen der ECT, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, besonders Johann F. Moltmann, Hans Schallnaß, Karen Duis und Michael Meller.

Danke an Dirk Löffler für die lehrreiche Einführung in die Dünnschichtchromatographie und die Hilfe im Isotopenlabor.

Danke an alle Freunde, die dazu beigetragen haben, mein Leben und meine Arbeit ohne größere Krisen in Einklang zu bringen.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	iii
	Glossar	iv
1	Einleitung: Humanpharmaka und Körperpflegeprodukte.....	1
1.1	Rückstände in der Umwelt	1
1.2	Eintragswege in die Umwelt	2
1.3	Umweltrelevante Eigenschaften	3
1.4	Aktivitäten der EU zur Umweltrisikobewertung von Pharmaka	4
1.4.1	Allgemeines Prinzip von Umweltrisikobewertungen.....	4
1.4.2	Europäischer Richtlinienentwurf zur Umweltrisikobewertung von Humanpharmaka	6
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	9
2	Wirkungsabschätzung für ausgewählte PPCPs.....	13
2.1	Material und Methoden.....	13
2.1.1	Ausgewählte Substanzen	13
2.1.2	Auswahl der durchzuführenden ökotoxikologischen Effektstudien.....	19
2.1.3	Algenwachstum-inhibitionstest	21
2.1.4	Daphnien-Toxizitätstest.....	25
2.1.5	Fisch-Toxizitätstests.....	27
2.1.6	Fischembryo-Toxizitätstests	30
2.1.7	Daphnien-Reproduktionstest.....	32
2.1.8	Sediment-Toxizitätstests.....	35
2.1.9	Sediment-Bioakkumulationsstudie.....	43
2.2	Ergebnisse der ökotoxikologischen Studien.....	54
2.2.1	Resultate der durchgeführten Akuttests.....	54
2.2.2	Resultate des Daphnien-Reproduktionstests	74
2.2.3	Resultate der Sediment-Toxizitätstests.....	79
2.2.4	Resultate der Sediment-Bioakkumulationsstudie.....	88
2.3	Diskussion der durchgeführten ökotoxikologischen Studien	93
2.3.1	Akuttests	93
2.3.2	Daphnien-Reproduktionstest.....	95
2.3.3	Sediment-Toxizitätsstudien	95
2.3.4	Sediment-Bioakkumulationsstudie.....	97
2.4	Zusammenfassung der empfindlichsten Effektdaten	101
3	Expositionsabschätzung für die ausgewählten PPCPs	103
3.1	Abschätzung der „ <i>predicted environmental concentration</i> “ – PEC	104
3.2	Umweltkonzentrationen der ausgewählten PPCPs	106
3.2.1	Bewertungsmethoden der Datenqualität von gemessenen Umweltkonzentrationen.....	107
3.2.2	Beurteilung der Datenqualität der recherchierten Quellen	108
3.2.3	Herleitung der „ <i>measured environmental concentrations</i> “ – MECs.....	109
3.3	PECs und MECs für die Umweltrisikobewertung.....	117

4	Risikocharakterisierung – Umweltrisikobewertung der ausgewählten PPCPs gemäß dem EMEA-Richtlinienentwurf	121
4.1	Phase I – PEC-Berechnung	121
4.2	Phase II Stufe A – <i>Fate</i> -Studien	122
4.3	Phase II Stufe A – erste quantitative Risikocharakterisierung	123
4.4	Phase II Stufe B – verfeinerte Risikocharakterisierung	124
4.5	Phase II Stufe B – weiterführende Effektstudien.....	125
4.5.1	Toxizität gegenüber sedimentbewohnenden Organismen	125
4.5.2	Biokonzentration	127
4.5.3	Toxizität gegenüber terrestrischen Organismen.....	130
4.5.4	PBT- und vPvB-Substanzen	131
4.6	Ergebnis der Umweltrisikobewertungen für die ausgewählten PPCPs.....	132
4.7	Möglichkeiten zur Verfeinerung der durchgeführten Umweltrisikobewertungen	134
5	Diskussion des EMEA-Richtlinienentwurfs	137
5.1	Eine spezifische Umweltrisikobewertung für Humanpharmaka?.....	137
5.2	Anwendung eines Schwellenwertes bei der anfänglichen Expositionsabschätzung	138
5.3	Integration des Kompartiments Sediment in das Bewertungsschema	139
5.4	Integration pharmakologischer Erkenntnisse in die Umweltrisikobewertung.....	140
5.4.1	Antimikrobiell wirksame Stoffe.....	140
5.4.2	Endokrin wirksame Stoffe	141
5.4.3	Stoffe mit anderen Wirkungsweisen	142
5.5	Standard-Kurzzeittests zur Überprüfung der Ökotoxizität von Humanpharmaka.....	145
5.6	Entwicklungskosten von Humanpharmaka - Kosten ökotoxikologischer Studien	147
5.7	Vorschläge zur Verbesserung des bestehenden Konzepts zur Durchführung von Umweltrisikobewertungen für Humanpharmaka	148
5.7.1	Außerkraftsetzen des Schwellenwerts in der Expositionsabschätzung	148
5.7.2	Berücksichtigung von Pharmaka ohne definierbarer Tagesdosis in der Expositionsabschätzung.....	149
5.7.3	Kriterien zur Auslösung der Bewertung des Kompartiments Sediment	149
5.7.4	Kriterien zur Auslösung der Bewertung des terrestrischen Kompartiments.....	149
5.7.5	Testmethoden für antimikrobielle Wirkstoffe.....	149
5.7.6	Testmethoden für endokrin wirksame Stoffe.....	150
5.7.7	Obligatorische Durchführung von Langzeitstudien für alle Humanpharmaka	152
5.8	Risikomanagement und Risikominderungsmaßnahmen	153
6	Zusammenfassung.....	155
7	Literaturverzeichnis.....	157
8	Anhang	169

Abkürzungen (soweit nicht im Glossar erläutert)

AF	Akkumulationsfaktor
AHTN	Tonalid (synthetischer, polyzyklischer Moschusduftstoff)
BF	Bewertungsfaktor
BG	Bestimmungsgrenze
CBZ	Carbamazepin (antiepileptischer Wirkstoff, auch Psychotherapeutikum)
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DDD	<i>defined daily dose</i> – definierte Tagesdosis; wurde gemäß der Festlegung der WHO verwendet (WHO Collaborating Centre, 2003)
dpm	<i>disintegrations per minute</i> – Zerfälle pro Minute
DT ₅₀	<i>disappearance time</i> – die Zeit, in der die anfängliche Konzentration der Testsubstanz um 50% reduziert wird
EC _x	Konzentration, bei der x% des Maximaleffekts auftritt
EE2	17 α -Ethinylöstradiol (synthetisches Östrogen, Wirkstoff in Kontrazeptiva)
EMA	<i>The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products</i> – Europäische Arzneimittelagentur (http://www.emea.eu.int/)
FG	Frischgewicht
F_{pen}	Faktor für den Markterfolg (Verkauf von Pharmaka)
GC-(ESI)-MS/MS	Gaschromatographie (Elektrospray-Ionisations) Tandem-Massenspektrometrie
HHCB	Galaxolid (synthetischer, polyzyklischer Moschusduftstoff)
K _{ow}	<i>n</i> -Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient
K _{oc}	Organischer Kohlenstoff-Wasser Verteilungskoeffizient (auf organischen Kohlenstoff normierter Adsorptionskoeffizient)
LC-(ESI)-MS/MS	<i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> – Flüssigkeitschromatographie (Elektrospray- Ionisations) Tandem-Massenspektrometrie
LC _x	Konzentration, die für x% der Testorganismen letal wirkt
LSC	<i>liquid scintillation counter</i> – Flüssig-Szintillations-Zähler
MEC	<i>measured environmental concentration</i> – gemessene Umweltkonzentration
MEC _{OG}	MEC im Oberflächengewässer
NG	Nachweisgrenze
PBT	<i>persistent, bioaccumulative, toxic</i> – Substanzen, die persistent, bioakkumulierend und toxisch sind
PEC	<i>predicted environmental concentration</i> – zu erwartende Umweltkonzentration
PEC _{OG}	PEC im Oberflächengewässer
PPCPs	<i>pharmaceuticals and personal care products</i> – Pharmaka und Körperpflegeprodukte
SMX	Sulfamethoxazol (antibiotischer Wirkstoff, Sulfonamid)
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo[1,4]dioxin („Seveso-Dioxin“)
TG	Trockengewicht
TGD	<i>Technical Guidance Document</i> (EC, 2003)
TOC	<i>total organic carbon</i> – Gesamtgehalt organischen Kohlenstoffs
vPvB	<i>very persistent, very bioaccumulative</i> – Substanzen, die sehr persistent und sehr bioakkumulierend sind

Glossar

- acceptable intake* Eine Schätzung der maximalen Substanzmenge in kontaminierter Nahrung, bezogen auf das Körpergewicht (meist mg/kg FG), welche vom Organismus aufgenommen werden kann, ohne gesundheitliche Auswirkungen hervorzurufen.
- action limit* Schwellenwert, der bei Erreichen weitere Maßnahmen erforderlich macht
- BAF Bioakkumulationsfaktor – Quotient aus der Testsubstanzkonzentration im Organismus und der Testsubstanzkonzentration im umgebenden Medium im *steady state*. Der Wert beinhaltet die Anreicherung der Testsubstanz über alle potenziellen Aufnahmepfade.
- BCF Biokonzentrationsfaktor – Quotient aus der Testsubstanzkonzentration im Organismus und der Testsubstanzkonzentration im umgebenden Medium im *steady state*, wenn die Anreicherung ausschließlich über die Körperoberfläche erfolgt.
- BSAF Biota-Sediment-Akkumulationsfaktor – der Quotient aus der auf den Lipidgehalt normierten Testsubstanzkonzentration im Organismus und der auf den organischen Kohlenstoffgehalt normierten Testsubstanzkonzentration im Sediment im *steady state*.
- CBB *critical body burden*: „kritische Körperbelastung“ – die maximale Substanzkonzentration im Organismus, bei welcher keine Effekte zu erwarten sind
- EC₅₀ *median effective concentration*: mittlere Effektkonzentration – eine statistisch hergeleitete Konzentration, bei der über eine definierte Expositionszeit ein bestimmter toxischer Effekt (z.B. Immobilisierung) bei 50% der Testpopulation zu erwarten ist
- Endokrine Disruptoren Exogene Verbindungen (Umweltchemikalien), die auf Grund von Änderungen der endokrinen Funktion negative Auswirkungen auf die Gesundheit des intakten Organismus oder seiner Nachkommen haben (können bereits im Spurenbereich wirksam sein)
- fate-Studie* lat. *Fatum* = Schicksal – Studie zu Verhalten und Verbleib einer Substanz in der Umwelt
- Imposex Akronym für „*superimposed sex*“: Pseudohermaphroditismus; zusätzliche Ausbildung männlicher Geschlechtsorgane (Penis und/oder *Vas deferens*) bei Weibchen getrenntgeschlechtlicher Prosobranchier
- Intersex Störung der Geschlechtsdifferenzierung mit Widersprüchen in der Ausbildung der allgemeinen äußeren geschlechtlichen Erscheinung, der Keimdrüsen bzw. Geschlechtsorgane, sowie des chromosomalen Geschlechts
- LC₅₀ *median lethal concentration*: mittlere letale Wirkkonzentration – eine statistisch hergeleitete Konzentration, bei der über eine definierte Expositionszeit 50% Mortalität der Testpopulation zu erwarten sind
- LOEC *lowest observed effect concentration*: niedrigste getestete Konzentration, die noch einen signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrolle hervorruft
- NOEC *no observed effect concentration*: höchste getestete Konzentration, die keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrolle hervorruft
- peaks* gemessene Höchstwerte bei spektrometrischen Analyseverfahren
- PNEC *predicted no effect concentration*: zu erwartende „Nicht-Effekt-Konzentration“ – die Konzentration, bei der die Wahrscheinlichkeit vernachlässigbar gering ist, dass eine inakzeptable ökosystemare Wirkung auftritt

secondary poisoning („Sekundäre Vergiftung“) beschreibt den Prozess, bei dem in einem Organismus durch die Aufnahme einer Substanz über kontaminierte Nahrung toxische Effekte verursacht werden

steady state das Gleichgewicht zwischen den während der Aufnahmephase simultan auftretenden Aufnahme- und Eliminationsvorgängen (nach der OECD-Richtlinie 305 zur Durchführung von Fisch-Biokonzentrationsstudien (OECD, 1996) gilt das *steady state* als erreicht, wenn die Abweichung dreier aufeinander folgender Konzentrationsmessungen nicht mehr als $\pm 20\%$ beträgt.)

Vitellogenin Vorläufersubstanz eines Eidotterproteins, welche natürlicherweise nur von geschlechtsreifen weiblichen Fischen gebildet wird

1 Einleitung: Humanpharmaka und Körperpflegeprodukte

1.1 Rückstände in der Umwelt

Die Belastung von Gewässern mit Umweltchemikalien ist seit langem ein vieldiskutiertes Thema in der Öffentlichkeit und Politik. Je nach aktuellen Vorkommnissen und gesellschaftlichen Bedingungen tritt die Thematik dabei mehr oder weniger in den Vordergrund. So verursachten z.B. Industrieunfälle wie 1976 im ICMESA-Werk der Genfer Kosmetikfirma Givaudan in Seveso (Freisetzung von TCDD) oder 1986 bei Sandoz in Basel (Vergiftung des Rheins mit kontaminiertem Löschwasser) ein verstärktes öffentliches Interesse zum Thema Gefährdung der Umwelt durch Chemikalien.

Die Freisetzung von Humanpharmaka und Körperpflegeprodukten (*pharmaceuticals and personal care products* – PPCPs) in Oberflächengewässer, Grundwässer und sogar Trinkwasser wurde über lange Zeit von der Öffentlichkeit nicht wahrgenommen. Dabei wurden bereits in den 1970er Jahren umfassende Messungen zum Vorkommen von hormonellen Wirkstoffen in Trinkwasser aus deutschen Quellen und Brunnen durchgeführt, wobei mittels Radioimmunoassay die Hormone Östradiol, Ethinylöstradiol und Diethylstilbestrol bis in den niedrigen ng/L-Bereich nachgewiesen wurden (Rurainski et al., 1977). Zu Beginn der 1990er Jahre wurde erstmals Clofibrinsäure, der aktive Metabolit verschiedener Lipidregulatoren, in Berliner Grundwässer nachgewiesen (Stan & Linkenhäger, 1992). Zwei Jahre danach veröffentlichten Stan et al. (1994) eine Studie, bei der Clofibrinsäure in Konzentrationen bis zu 165 ng/L in Leitungswasser gefunden wurde. Seither wurde wiederholt das Vorkommen von Pharmaka in geringen Konzentrationen in Grund- und Trinkwasser bestätigt (z.B. Heberer, 2002; Stackelberg et al., 2004).

In den vergangenen Jahren gelangte die Kontamination der aquatischen Umwelt mit Arzneimittelwirkstoffen und deren Rückständen zunehmend in den Blickpunkt wissenschaftlicher, umweltpolitischer und öffentlicher Interessen. Verschiedene Messprogramme, teilweise von Behörden initiiert und gefördert (z.B. Ternes et al., 1999a; BLAC, 2003), hatten die Überprüfung des Vorkommens von Humanpharmaka und deren Rückstände in unterschiedlichen, meist aquatischen Umweltkompartimenten zum Ziel. Dabei wurden Arzneimittelkonzentrationen im Bereich von wenigen ng/L bis mehreren µg/L in Oberflächengewässern nachgewiesen. Mehrere umfangreiche Studien und Übersichtsartikel veranschaulichen, dass das Vorkommen von Humanpharmakawirkstoffen kein lokales, sondern ein Problem aller industrialisierten, aber auch von Schwellenländer darstellt (z.B. Halling-Sørensen et al., 1998; Daughton & Ternes, 1999; Heberer, 2002; Kolpin et al., 2002a; Metcalfe et al., 2003a,b).

Das Vorkommen von Rückständen aus Körperpflegeprodukten in der Umwelt gelangte verstärkt in das öffentliche Interesse, als bekannt wurde, dass einige dieser Substanzen auf Grund ihrer Lipophilie in Organismen akkumulieren (z.B. Rimkus & Wolf, 1993), wobei manche Stoffe als toxikologisch bedenklich eingestuft wurden, wie z.B. die Nitromoschusverbindung

Moschus Xylol (Brunn & Rimkus, 1997). Besondere Besorgnis erregten wiederholte Befunde von Moschusduftstoffen in Humanfett und Humanmilch (Liebl & Ehrenstorfer, 1993; Müller et al., 1996; Rimkus & Wolf, 1996; Zehring & Herrmann, 2001).

Obwohl die Kenntnisse über das Gefährdungspotenzial der Umwelt, ihrer Organismen und letztlich auch des Menschen durch Kontaminationen mit Pharmakarückständen und Körperpflegeprodukten noch sehr begrenzt und wenig fundiert sind, wurde vor allem durch Berichte über Verweiblichung und Intersex bei Fischen (z.B. Purdom et al., 1994; Jobling et al., 1998; Viganó et al., 2001; Bachmann Christiansen et al., 2002), die mit östrogen wirksamen Stoffen in Verbindung gebracht werden, das öffentliche und mediale Interesse geweckt.

In Deutschland werden jährlich ca. 30.000 t Arzneimittelwirkstoffe in der Humanmedizin verabreicht. Hinzu kommen ca. 2.500 t, die in der Veterinärmedizin zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden, und eine unbekannte Menge von zum Teil gleichen Wirkstoffen als Futtermittelzusatzstoffe (Rönnefahrt et al., 2002). Eine grobe Abschätzung der transportierten Arzneimittelfracht im Main, basierend auf gemessenen Analysendaten, resultierte für mehrere Wirkstoffe, darunter für das Antiepileptikum Carbamazepin, in einer Jahresfracht zwischen 300 und 500 kg (BLAC, 2003). Dies sind ähnliche Mengen, wie sie für einzelne Wirkstoffe von Pflanzenschutzmitteln (z.B. bei Isoproturon ca. 700 kg/a, Diuron 100 kg/a) festgestellt wurden (BLAC, 2003). Die Ergebnisse von Untersuchungsprogrammen verschiedener deutscher Fließgewässer legen den Schluss nahe, dass die Summe von Arzneimittelrückständen regelmäßig 1 µg/L bei weitem überschreitet. Diese Konzentration liegt damit in einer vergleichbaren Größenordnung wie für Pflanzenschutzmittel. Allerdings unterliegen die Konzentrationen für Pflanzenschutzmittel großen jahreszeitlichen Schwankungen, die für die meisten Humanpharmaka nicht in dieser Form zu erwarten sind. Somit kann angenommen werden, dass die jährliche Belastung der Fließgewässer mit Arzneimitteln größer ist als mit Pflanzenschutzmitteln (BLAC, 2003).

Das Produktionsvolumen von Körperpflegeprodukten ist deutlich größer als das von pharmazeutischen Produkten. Bereits zu Beginn der 1990er Jahre betrug die jährliche Produktionsmenge allein in Deutschland mehr als 550.000 t, wovon der größte Anteil auf flüssige Badezusätze, Seifen und sonstige Hautpflege-, Haarwasch- und Zahnpflegemittel entfiel (Ternes et al., 2003b).

1.2 Eintragswege in die Umwelt

Beide Substanzgruppen, Humanpharmaka und Inhaltsstoffe von Körperpflegeprodukten, haben Gemeinsamkeiten in Bezug auf den Eintragsweg in die Umwelt. Sie erreichen zum größten Teil nach ihrem bestimmungsgemäßen Gebrauch über das Abwasser und nach der Passage von Kläranlagen die aquatische Umwelt. Dabei gelangen die meisten Inhaltsstoffe von Körperpflegeprodukten unverändert und direkt in das Abwassersystem, während die meisten Humanpharmaka in Abhängigkeit von ihrer Darreichungsform und ihren physikalischen und

chemischen Eigenschaften nach der Körperpassage entweder unverändert oder metabolisiert renal mit dem Urin oder biliär und intestinal mit den Faeces ausgeschieden werden (Mutschler, 1996). Die meisten konventionellen kommunalen Kläranlagen sind nicht darauf ausgelegt, organische Spurenstoffe wie z.B. Pharmakarückstände zu eliminieren, sondern dienen im Wesentlichen der Beseitigung von Fest- und Schwebstoffen bzw. von gelösten Substanzen, die im Gewässer zu einer Sauerstoffzehrung führen. Aus diesem Grund sind Belastungen von geklärtem Abwasser in geringen Konzentrationen mit Pharmakarückständen und Inhaltsstoffen von Körperpflegeprodukten zu erwarten, was vielfach in Monitoringstudien bestätigt werden konnte (z.B. Heberer, 2002; Metcalfe et al., 2003a; Stackelberg et al., 2004). Bei erhöhtem Adsorptionsverhalten kann ein gewisser Anteil dieser Substanzen via Klärschlamm das terrestrische Kompartiment erreichen, da in Deutschland gegenwärtig ca. 55% des anfallenden Klärschlammes auf in der Landwirtschaft und im Landschaftsbau genutzte Flächen ausgebracht wird (Rönnefahrt et al., 2002). In Laborversuchen zur Verteilung zwischen Wasser- und Schwebstoffphase konnte allerdings gezeigt werden, dass die ausgewählten polaren Arzneimittelwirkstoffe bevorzugt in der Wasserphase verbleiben (BLAC, 2003).

1.3 Umweltrelevante Eigenschaften

Arzneimittel sind zur Anwendung bei Menschen oder Tieren bestimmte Zubereitungsformen von Arzneistoffen; diese wiederum sind Wirkstoffe, die zur Vorbeugung, Linderung, Heilung oder Erkennung von Erkrankungen dienen können (Mutschler, 1996). Besondere Besorgnis auf Grund der Kontamination der Umwelt mit Arzneimittel ergibt sich aus der Tatsache, dass diese im Gegensatz zu anderen Chemikalien als Substanzen mit spezifischen biologischen Wirkungen entwickelt werden. Arzneimittelwirkstoffe sind in der Regel so konzipiert, dass sie bei der Körperpassage in bestimmtem Maße der Biotransformation und somit dem Abbau im Organismus widerstehen, um bei einer minimalen Dosierung mit ausreichender Wirksamkeit zum Wirkort zu gelangen. Entsprechend weisen die meisten Arzneimittelwirkstoffe eine erhöhte Stabilität und geringe Bioabbaubarkeit auf. Eine Ausnahme sind die sogenannten „*Prodrugs*“, die selbst weitgehend inaktiv sind und im Organismus in eine aktive Form umgewandelt werden (z.B. Clofibrat in Clofibrinsäure, zur Steigerung der Resorptionsquote) (Mutschler, 1996). Außerdem besitzen Wirkstoffe systemischer Pharmaka eine gewisse Lipophilie als Grundvoraussetzung, um aus dem Gastrointestinal-Trakt resorbiert zu werden (Pittenauer, 2002). Diese potenziellen Eigenschaften – optimierte biologische Wirksamkeit, geringe Bioabbaubarkeit und oft erhöhte Lipophilie – machen Arzneimittelwirkstoffe zu einer Substanzgruppe mit besonderer Umweltrelevanz.

Veterinärpharmaka unterscheiden sich bezüglich ihrer Stoffeigenschaften prinzipiell nicht von Humanpharmaka. Einige Wirkstoffe werden sowohl in der Tiermedizin (als Tierarzneimittel oder als Futtermittelzusatzstoff) als auch in der Humanmedizin verwendet, wie z.B. die Broncholytika und Sekretolytika Bromhexin und Clenbuterol, das Antiphlogistikum Ketoprofen, die Steroidhormone Östradiol, Östriol und Ethinylöstradiol, aber auch viele Antibiotika wie z.B. Erythromycin, Sulfamethoxazol, Tetracyclin und Amoxicillin (BLAC, 2003). Die Haupt-

eintragungspfade der beiden Pharmakagruppen in die Umwelt unterscheiden sich allerdings insofern, als Humanpharmaka nach der Ausscheidung beim Menschen über das kommunale Abwassersystem hauptsächlich in die aquatische Umwelt freigesetzt werden, während der Eintrag von Tierarzneimitteln mittels Gülle oder Tiermist zumeist über den Boden stattfindet. Von dort können Veterinärpharmaka entweder vertikal mit dem Sickerwasser in Grundwasser oder horizontal ins Oberflächenwasser verlagert werden.

1.4 Aktivitäten der EU zur Umweltrisikobewertung von Pharmaka

Mehrere Richtlinien der EU zur Umweltrisikobewertung von Chemikalien, Pestiziden und Veterinärpharmaka im Rahmen des Zulassungsverfahrens ‚neuer‘ Substanzen, bzw. der Zulassungsverlängerung ‚alter‘ Substanzen wurden bereits verabschiedet (EC, 1996; EMEA, 1997; EC, 2003). Aus umweltpolitischer Verantwortung sah sich die Europäische Kommission veranlasst, eine rechtlich bindende Vorschrift für die Durchführung von Umweltrisikobewertungen von Humanpharmaka als Bestandteil für das Arzneimittelzulassungsverfahren zu schaffen. Inzwischen wurde ein trilaterales Programm zwischen der Europäischen Union, den USA und Japan entwickelt (VICH – *International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Products*), welches die Harmonisierung der technischen Anforderungen zur Zulassung von Veterinärpharmaka als Ziel hat (EMEA, 2003b).

1994 wurde von der Europäischen Kommission ein erster Entwurf eines Leitfadens für die Umweltrisikobewertung von Humanpharmaka angefertigt (EC, 1994). Darauf aufbauend veröffentlichte im Jahr 2001 die 1995 gegründete Europäische Arzneimittelagentur EMEA ein Diskussionspapier zur Kommentierung (EMEA, 2001). Nach mehrfacher Kommentierung, u.a. durch das *Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment* (CSTEE, 2001), wurde das Diskussionspapier im Jahr 2003 in überarbeiteter Form als Richtlinienentwurf zur Durchführung von Umweltrisikobewertungen von Humanpharmaka erneut der Öffentlichkeit zur Kommentierung unterbreitet (EMEA, 2003a). Der Richtlinienentwurf bzw. seine Vorläufer dienten als Hintergrund sowohl für die konzeptionelle Gestaltung der experimentellen Untersuchungen als auch für die Durchführung von Umweltrisikobewertungen ausgewählter Substanzen im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

1.4.1 Allgemeines Prinzip von Umweltrisikobewertungen

Das primäre Ziel von Umweltrisikobewertungen ist, die in den verschiedenen Umweltkompartimenten (Luft, Boden, Wasser, Sediment) vorkommenden Organismen (Tiere, Pflanzen und Mikroorganismen) vor nachteiligen Auswirkungen durch in die Umwelt ausgebrachte Substanzen zu schützen. Im Gegensatz zu dem „*Human Health Risk Assessment*“ („Risikobewertung der menschlichen Gesundheit“) hat die Umweltrisikobewertung als Schutzziel nicht das Individuum, sondern Populationen und Ökosysteme (Fent, 1998).

Das heute weithin akzeptierte und verwendete Verfahren für die Beurteilung eines durch eine Substanz ausgehenden Umweltrisikos wurde bereits Ende der 1970er Jahre entwickelt (Fava et al., 1987), wobei damals die Bewertung von Pflanzenschutzmitteln im Mittelpunkt stand. Diese Prozedur ist ein einfaches und systematisches Mittel, um eine wissenschaftliche Entscheidungsbasis für regulatorische Maßnahmen zu schaffen, wobei die drei „klassischen“ Aufgaben der Ökotoxikologie – Identifizierung, Bewertung und Überwachung von unerwünschten Effekten – in diesem Prozess integriert sind (Römbke & Moltmann, 1996). Seit Ende der 1980er Jahre wurde das Verfahren zur Umweltrisikobewertung weiterentwickelt und verstärkt auch auf andere Substanzgruppen ausgerichtet. Eine zusammenfassende Einführung in die Prinzipien der Umweltrisikobewertung geben van Leeuwen & Hermens (1995).

Die Chemikalienbewertung auf europäischer Ebene orientiert sich heute im Wesentlichen an dem erstmals 1996 von der Europäischen Kommission veröffentlichten *Technical Guidance Document* TGD, welches vor kurzem einer Revision und Erweiterung unterzogen wurde (EC, 1996, 2003). In diesem sehr umfassenden und detaillierten Dokument wurden erstmals Richtlinien zur umweltkompartiment-spezifischen Ermittlung von Exposition und Wirkung von Substanzen und deren Bewertung verabschiedet. Dadurch bekam dieses Handbuch international einen zentralen Stellenwert auch für die Umweltrisikobewertung anderer Stoffgruppen, wie z.B. Pharmaka.

Die Umweltrisikobewertung besteht im Wesentlichen aus zwei Komponenten. Zum einen wird durch die Expositionsabschätzung die zu erwartende oder tatsächlich gemessene Umweltkonzentration ermittelt, die PEC (*predicted environmental concentration*). Für Altstoffe kann die PEC durch chemische Analysen von Proben des entsprechenden Kompartiments gemessen werden. Für neue, noch nicht zugelassene, bzw. noch nicht in die Umwelt gelangte Stoffe wird die PEC mittels Modellberechnungen abgeschätzt. Die andere Komponente betrifft die Wirkungsabschätzung, durch welche die maximale Konzentration ermittelt wird, bei der keine Effekte in der Umwelt zu erwarten sind, die PNEC (*predicted no effect concentration* oder ‚Nicht-Effekt-Konzentration‘). Die PNEC leitet sich in der Regel aus akuten oder chronischen Effektdaten mittels Division durch einen entsprechenden Bewertungsfaktor ab. Als Testorganismen dienen dabei vorzugsweise repräsentative Vertreter aus verschiedenen trophischen Ebenen, d.h. Produzenten (z.B. Algen), Konsumenten verschiedenen Grades (z.B. Daphnien oder Fische) und Destruenten (z.B. Mikroorganismen). Der Bewertungsfaktor reflektiert dabei den Grad der Unsicherheit bei der Extrapolation von in der Regel im Labor mit Einzelspezies-Studien erstellten Effektdaten auf die reale Situation in der Umwelt (s. auch Kapitel 4).

Die quantitative Risikocharakterisierung wird durch das Verhältnis von PEC zu PNEC für eine bestimmte Substanz ausgedrückt. Bildet der Quotient PEC/PNEC einen Wert ≥ 1 , d.h., ist die zu erwartende Umweltkonzentration größer oder gleich als die ermittelte ‚Nicht-Effekt-Konzentration‘, so indiziert dies ein wahrscheinliches, nicht vertretbares Risiko für das betrachtete Umweltkompartiment. In der Regel kann dann die Umweltrisikobewertung mit einer verbesserten Datenlage zur Expositionsabschätzung als auch zur Wirkungsabschätzung fort-

geführt werden. Falls bei der sich anschließenden zweiten quantitativen Risikocharakterisierung ein zuvor erkanntes Risiko nicht entkräftet wird, müssen entsprechende Sicherungsmaßnahmen ergriffen bzw. ein Risikomanagement eingeleitet werden.

1.4.2 Europäischer Richtlinienentwurf zur Umweltrisikobewertung von Humanpharmaka

Der Richtlinienentwurf zur Durchführung von Umweltrisikobewertungen von Humanpharmaka (EMA, 2003a; im Folgenden: Richtlinienentwurf) besteht aus einem zweiphasigen Bewertungskonzept, in dem Art und Umfang der Prüfanforderungen für die Umweltbewertung festgelegt werden. In Abb. 1.1 ist das Verfahren schematisch dargestellt.

Phase I besteht aus einer vorläufigen, groben Expositionsabschätzung für das Arzneimittel, bzw. des Arzneimittelwirkstoffs im Oberflächengewässer. Die Berechnung der PEC basiert in dieser Phase hauptsächlich auf einem Faktor für den Markterfolg des neuen Produkts und die maximale vorgeschriebene Tagesdosis. Die hierfür vorgeschlagenen Berechnungsmethoden sind in Abschnitt 3.1 ausführlich beschrieben. Die angenommenen Bedingungen und vorausgesetzten Größen der einzelnen Parameter beschreiben den ungünstigsten Fall für die Umwelt, d.h. die resultierende PEC sollte die tatsächlich eintretende Umweltkonzentration eher überschätzen.

Wird bei dieser Expositionsabschätzung der Schwellenwert von 10 ng/L („*action limit*“) als zu erwartende Umweltkonzentration (PEC) nicht überschritten, so wird vorausgesetzt, dass ein Risiko für die Umwelt durch die entsprechende Substanz niedrig ist, und die Umweltrisikobewertung kann beendet werden. Übersteigt die abgeschätzte PEC allerdings den Schwellenwert, so wird die Umweltrisikobewertung in Phase II fortgeführt.

Für Arzneimittelwirkstoffe, von denen bereits in Konzentrationen unterhalb des expositionsbezogenen Schwellenwertes von 10 ng/L Umweltwirkungen bekannt oder zu erwarten sind (z.B. endokrine Disruptoren), wird das *action limit* außer Kraft gesetzt. Damit wird unabhängig von der anfänglich abgeschätzten Umweltkonzentration eine Risikocharakterisierung nach dem vorgesehenen Schema in Phase II durchgeführt. Als Grundlage für das Außerkraftsetzen des *action limits* sollen Informationen über pharmakokinetische, pharmakodynamische und (human-)toxikologische Eigenschaften der entsprechenden Substanz herangezogen werden, welche dem Marktzulassungsantrag zu entnehmen sind.

In Phase II werden Verbleib und Verhalten sowie Effekte des Arzneimittelwirkstoffs in der Umwelt untersucht. Diese Phase der Umweltprüfung ist selbst wiederum in zwei Stufen gegliedert. In Stufe A der Phase II soll zunächst ein Basisdatensatz zu Verbleib und Verhalten der Substanz in der Umwelt (*fate*-Studien) und zu akuten Effekten gegenüber aquatischen Organismen ermittelt werden. Außerdem soll die Expositionsabschätzung mit neuen Daten verfeinert werden, um so eine zuverlässigere PEC zu erhalten.

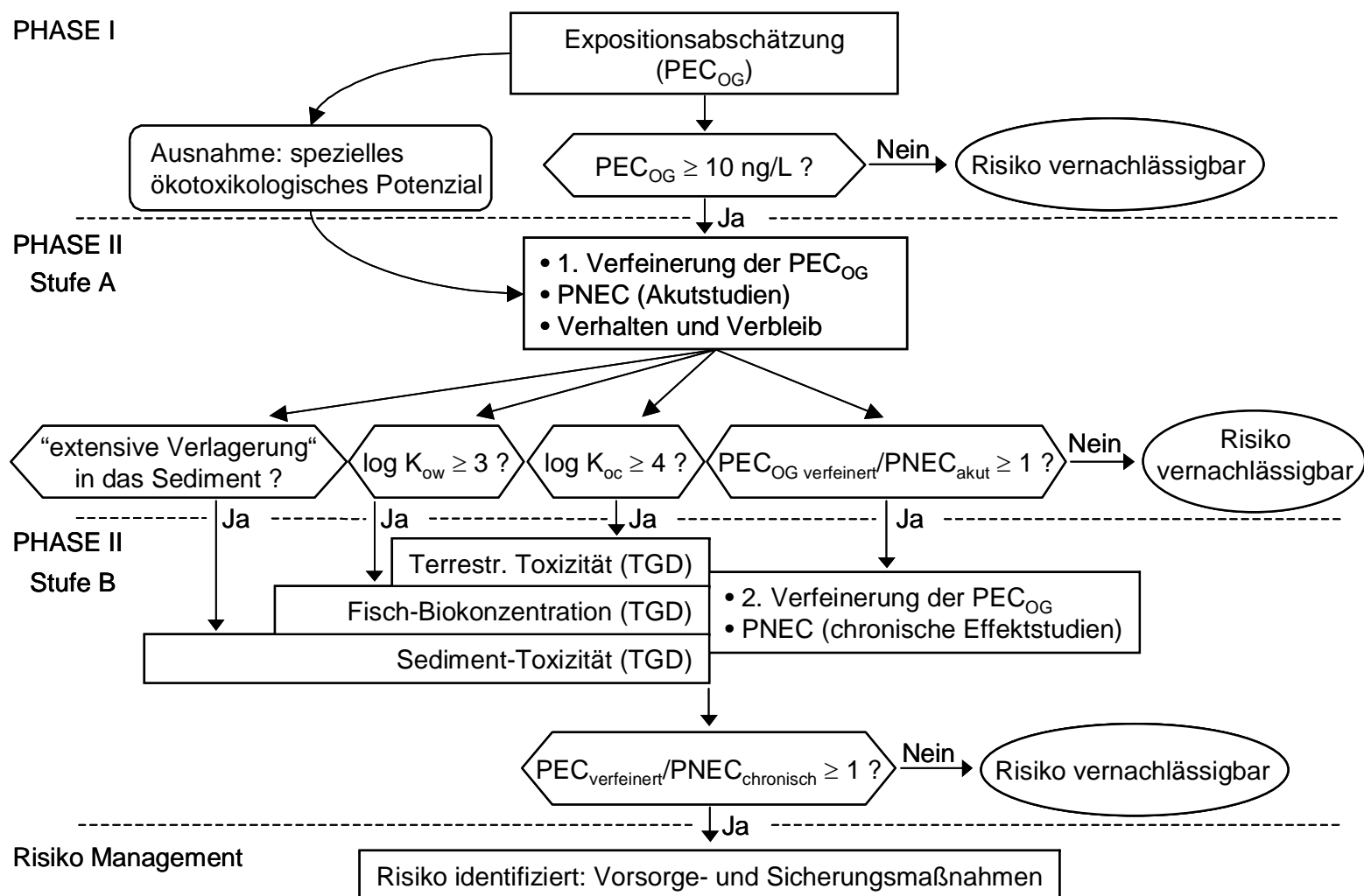


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Bewertungsverfahrens gemäß dem Richtlinienentwurf zur Durchführung von Umweltrisikobewertungen für Humanpharmaka (EMA, 2003a).

Bei den *fate*-Studien werden möglichst unter Anwendung von standardisierten OECD-Richtlinien physikalische und chemische Eigenschaften der untersuchten Substanz festgestellt, wie z.B. der Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient (K_{ow}) oder der auf organischen Kohlenstoff normierte Adsorptionskoeffizient (K_{oc}). Ergebnisse dieser *fate*-Studien können bei Überschreiten definierter Schwellenwerte die Durchführung weitergehender Studien in Stufe B der Phase II der Risikobewertung veranlassen. Danach erfordern Substanzen mit einem $K_{ow} \geq 1000$ die Durchführung einer Fisch-Biokonzentrationsstudie. Zur Bewertung des dabei ermittelten Bioakkumulations- und Biomagnifikationspotenzials wird auf das TGD (EC, 2003) verwiesen. Ein anderer definierter Schwellenwert ist der $K_{oc} = 10.000$. Bei Überschreiten dieses Wertes wird die Durchführung von Studien zur Bestimmung des Verhaltens im Boden und der Wirkung auf terrestrische Organismen gefordert, da davon auszugehen ist, dass solche Substanzen bei der Abwasserreinigung an Klärschlämme adsorbieren und durch deren Ausbringung auf Landflächen eine potenzielle Gefährdung terrestrischer Ökosysteme besteht. Der Basissatz von Studien für das terrestrische Kompartiment besteht aus Untersuchungen zum Bioabbau im Boden, zur Toxizität gegenüber Bodeninvertebraten und zu akuten Effekten gegenüber terrestrische Pflanzen und Mikroorganismen.

Unabhängig von den Ergebnissen der *fate*-Studien werden in Phase II Stufe A akute Effekte wie Mortalität, Immobilisierung und Wachstumshemmung gegenüber repräsentative aquatische Standardorganismen (Alge, Daphnie, Fisch) und Mikroorganismen unter Verwendung standardisierter Testverfahren ermittelt. Basierend auf den Ergebnissen dieser Kurzzeitstudien wird eine erste quantitative Abschätzung des Umweltrisikos für das aquatische Kompartiment durchgeführt. Hierzu wird unter Anwendung eines Bewertungsfaktors von 1000 auf die niedrigste LC_{50} (EC_{50}) der Akutstudien die PNEC errechnet. Liegt die durch eine verbesserte Modellberechnung ermittelte verfeinerte Umweltkonzentration des Arzneimittelwirkstoffs (PEC) höher als die PNEC, d.h., ist der Quotient $PEC/PNEC \geq 1$, so müssen im Rahmen der Stufe B der Phase II längerfristige toxische Wirkungen untersucht werden. Anderenfalls wird die Umweltrisikobewertung beendet, da von einem geringen, tolerierbaren Umweltrisiko ausgegangen werden kann.

Langzeitstudien zur chronischen Toxizität in Phase II Stufe B bestehen wiederum zunächst aus Tests mit den Standardorganismen Alge, Daphnie und Fisch. Erneut wird dabei auf das TGD (EC, 2003) verwiesen, welches eine Übersicht über geeignete Teststrategien und eine Hilfe zur Auswahl geeigneter Testspezies gibt. Die Bewertungsfaktoren zur Herleitung von auf chronischen Effektdaten basierenden PNECs werden entsprechend dem Umfang der verfügbaren Daten gemäß dem TGD angepasst. Die PEC soll in dieser Stufe weiter verfeinert werden, indem Erkenntnisse aus Phase II Stufe A über das Abbauverhalten des Arzneimittels in der Umwelt berücksichtigt werden. Informationen über das pharmakokinetische Verhalten der Substanz und das Ausscheidungsmuster beim Menschen können ebenfalls in diese PEC-Berechnung einbezogen werden.

Somit wird in Abhängigkeit von den Testergebnissen stufenweise eine sich verfeinernde Risikobetrachtung („*risk refinement*“) durchgeführt. Das Ziel dieses Vorgehens ist es, die Aussa-

gekraft und somit die Sicherheit der Umweltrisikobewertung durch aufwendigere, auf die Eigenschaften der Substanz abgestimmte Prüfungen zu erhöhen und soweit möglich ein ursprünglich unter vereinfachten, im Interesse des Umweltschutzes getroffenen Annahmen erkanntes Risiko zu überprüfen. Wird das erhöhte Risiko in der verfeinerten Risikobewertung bestätigt, muss im Rahmen eines Risikomanagements nach Möglichkeiten der Risikominde- rung gesucht werden und entsprechende Vorsorgemaßnahmen getroffen werden.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen wissenschaftliche Grundlagen zur Durchführung von Umweltrisikobewertungen von Humanpharmaka überprüft und verbessert werden. Hierzu sollen erstmals gemäß dem vorgestellten aktuellen europäischen Bewertungskonzept (EMA, 2001, 2003a) mit mehreren ausgewählten Substanzen unterschiedlicher Stoffgruppen Umweltrisikobewertungen durchgeführt werden. Dabei soll untersucht werden, ob das zu Grunde liegende europäische Konzept für die Bewertung von Humanpharmaka den Ansprüchen einer vorsorgenden Umweltprüfung im Zulassungsverfahren gerecht wird. Der Entwurf des europäischen Bewertungskonzepts soll kritisch evaluiert und Verbesserungsmöglichkeiten aufgezeigt werden. Zum Vergleich der Anwendbarkeit des Bewertungskonzepts für Humanpharmaka auf andere Substanzgruppen, bzw. zur Überprüfung der spezifischen auf Humanpharmaka ausgerichteten Anpassungen des Richtlinienentwurfs wurde ein polyzyklischer Moschusduftstoff als Vertreter der Inhaltsstoffe von Körperpflegeprodukten in die Untersuchungen mit einbezogen.

Zur Durchführung von Umweltrisikobewertungen sind umfassende und verlässliche Expositions- und Effektdaten erforderlich. Um eine solide Datenbasis und eine weitreichende Übersicht über die derzeitige Datenlage zu erhalten, wurden Literaturrecherchen zu entsprechenden Daten der ausgewählten Substanzen durchgeführt. Die Qualität der erhaltenen Daten wurde anhand eines im TGD (EC, 2003) verfügbaren Kriterienkatalogs überprüft. Von den Expositionsdaten wurden durchschnittliche Konzentrationen der ausgewählten Substanzen in deutschen Oberflächengewässern basierend auf 90. Perzentile berechnet. Die aus den Literaturrecherchen erhaltenen Effektdaten dienten gemeinsam mit den Resultaten der eigenen durchgeführten Studien als Grundlage für die Wirkungsabschätzung (Herleitung einer PNEC).

Das für diese Arbeit zu Grunde gelegte Bewertungskonzept basierte zunächst auf dem Diskussionspapier, welches im Januar 2001 von der Europäischen Arzneimittelagentur EMA veröffentlicht wurde. Während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurde im Juli 2003 der gegenüber dem EMA-Diskussionspapier wesentlich erweiterte Richtlinienentwurf zur Kommentierung veröffentlicht (EMA, 2003a). Dieser beinhaltete eine detailliertere Beschreibung der in Phase II Stufe B erforderlichen Untersuchungen, wobei nun auch aquatische Sedimente, das terrestrische Kompartiment und die Möglichkeit der Biokonzentration berücksichtigt wurden. Da zum Zeitpunkt der Veröffentlichung des Richtlinienentwurfs die vorgesehenen experimentellen Arbeiten bereits abgeschlossen waren, konnten die Elemente des er-

weiterten Bewertungsschemas nicht in vollem Umfang in die Umweltrisikobewertungen mit einbezogen werden. Allerdings wurden bereits unabhängig von den Anforderungen des überarbeiteten Richtlinienentwurfs mit relevanten Substanzen Sediment-Toxizitätstests und eine Sediment-Bioakkumulationsstudie durchgeführt. Da das Kompartiment Sediment im Bewertungskonzept des Diskussionspapiers (EMEA, 2001) zunächst keine Berücksichtigung fand, sollte auf diesem Wege untersucht werden, ob das Sediment einen relevanten Expositionsweg für aquatische Organismen gegenüber Humanpharmaka und Körperpflegemittel darstellen kann. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Akkumulation von Wirkstoffen in sedimentbewohnenden Organismen zur potenziellen (sekundären) Kontaminationsquelle von Prädatoren höherer trophischer Ebenen werden und somit zum sogenannten *secondary poisoning* führen kann.

In dem von der EMEA vorgeschlagenen mehrstufigen Bewertungskonzept basiert die Wirkungsabschätzung zunächst auf etablierten akuten Wirkungstests mit Algen, Daphnien, Fischen und Mikroorganismen. Die besonderen intrinsischen Eigenschaften von Humanpharmaka und die kontinuierliche Exposition dieser Substanzen lassen die Frage aufkommen, ob der Aussagewert solcher Kurzzeitstudien für eine Umweltrisikobewertung von Humanpharmaka angemessen ist. Die Durchführung von entsprechenden Studien und der darauf folgende Vergleich von für ausgewählte Substanzen ermittelten akuten Effektdaten zu entsprechenden chronischen Daten sollen dieser Fragestellung nachgehen.

Das Bewertungskonzept des Diskussionspapiers (EMEA, 2001) beinhaltet bereits einen konzentrationsabhängigen Schwellenwert in Phase I, der eine vertiefte Umweltrisikobewertung in Phase II auslöst. Das Prinzip der Anwendung eines solchen Schwellenwertes wurde im überarbeiteten Richtlinienentwurf von 2003 übernommen. Die Bedeutung und Sinnhaftigkeit dieses Schwellenwertes für die Umweltrisikobewertung von Humanpharmaka ist eine der Fragestellungen, die mittels der Anwendung des vorgeschlagenen Bewertungsschemas auf mehrere Substanzen überprüft werden soll.

Ergänzend soll überprüft und diskutiert werden, inwiefern die Integration pharmakologischer Erkenntnisse über spezifische Wirkungsweisen und Wirkungsmechanismen von Humanpharmaka bei der Bewertung deren Umweltrisikos möglich ist, und inwiefern die Notwendigkeit zur Neuentwicklung oder zur Anpassung existierender Teststrategien auf spezifische Wirkungsweisen und Wirkungsmechanismen besteht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich, zu dieser Thematik experimentelle Studien durchzuführen, weshalb diese Fragestellung basierend auf der zur Zeit verfügbaren Datenlage in der anschließenden Diskussion ausführlich erörtert wird.

Die hier vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des von der EU geförderten Projekts POSEIDON angefertigt (<http://eu-poseidon.com> – Förderkennzeichen: EVK1-2000-00546). Zielsetzungen dieses Projekts waren u.a. die Entwicklung und Verbesserung von Abwasser- und Trinkwasserreinigungstechniken bezüglich der Elimination von Pharmaka- und Körperpflegemittelrückständen und die Durchführung von Umweltrisikobewertungen ausgewählter Substanzen

anhand des europäischen Bewertungskonzepts. Die Durchführung der praktischen Arbeiten und die Ausarbeitung der Dissertation fanden bei der ECT Oekotoxikologie GmbH in Flörsheim statt.

Für mehrere aus dem Englischen stammende Fachtermini wurde in der vorliegenden Arbeit bewusst auf deren Übersetzung ins Deutsche verzichtet, sofern sich diese Begriffe in der internationalen wissenschaftlichen Fachliteratur etabliert haben (z.B. *PEC* oder *PNEC*). Alle verwendeten englischen Begriffe und Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis oder im Glossar erläutert.

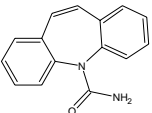
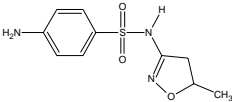
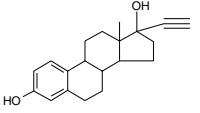
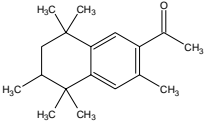
2 Wirkungsabschätzung für ausgewählte PPCPs

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Ausgewählte Substanzen

Es wurden vier Substanzen für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählt (Tab. 2.1). Als Auswahlkriterium dienten die Zugehörigkeit zu unterschiedlichen pharmakotherapeutischen Gruppen bzw. Produktgruppen und die Verfügbarkeit relevanter Informationen über die Eigenschaften der Substanzen und über bereits in der Literatur vorhandenen Expositions- und Effektdaten. Im Folgenden werden die vier ausgewählten Substanzen näher beschrieben. Ergänzende Informationen zu physikalischen und chemischen Eigenschaften, Pharmakodynamik, Pharmakokinetik und Nebenwirkungen der Substanzen befinden sich in Abschnitt 8.1 im Anhang.

Tab. 2.1: Für ökotoxikologische Effektstudien ausgewählte Substanzen, deren Zuordnung zu chemischen und pharmazeutischen, bzw. Produktgruppen, sowie der Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient ($\log K_{ow}$) und die Wasserlöslichkeit (S).

Wirkstoff/Substanz (Abkürzung)	Pharmazeutische/ Produktgruppe	Chemische Gruppe	$\log K_{ow}$	S [mg/L]	Strukturformel
Carbamazepin (CBZ)	Antiepileptikum, Psychopharmakon	trizyklisches Dibenzazepin-Derivat	2,45	17,7	
Sulfamethoxazol (SMX)	Antibiotikum	Sulfonamid	0,89	610	
17 α -Ethinylöstradiol (EE2)	Orales Kontrazeptivum	Synthetisches Steroidhormon	4,2	18,6	
Tonalid (AHTN)	Synthetischer Moschusduftstoff	Bizyklisches alkyliertes Tetralinderivat	5,7	1,22	

Antiepileptika – Carbamazepin (CBZ)

Antiepileptika dienen der symptomatischen Behandlung verschiedener Epilepsieformen. Dabei muss ein Präparat die Krampfschwelle erhöhen, aber dabei die normale motorische Erregbarkeit möglichst gering beeinflussen, es soll in krampfhemmenden Dosen möglichst wenig sedativ bzw. hypnotisch sein, und es darf auch bei Daueranwendung nur geringe Nebenwirkungen aufweisen (Mutschler, 1996).

Das trizyklische Dibenzazepin-Derivat Carbamazepin (CBZ) wurde 1957 synthetisiert und ist in den folgenden Jahren zu einem wichtigen Präparat in der Epilepsitherapie geworden (Müller-Oerlinghausen, 1989). Heute gehört CBZ zu den wichtigsten und am meisten verwendeten

Antiepileptika (Mutschler, 1996; Schwabe & Paffrath, 2003). 1998 fiel die Hälfte aller in Deutschland verschriebenen Antiepileptika auf CBZ; insgesamt wurden 74 Millionen Tagesdosen CBZ verschrieben (Schwabe & Paffrath, 2000). Die definierte Tagesdosis beträgt 1 g/d (WHO Collaborating Centre, 2003), dementsprechend betrug die insgesamt in Deutschland verschriebene Menge an CBZ 74 t (Abb. 2.1). Laut eines Berichts des Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit (BLAC) stieg die Gesamtmenge von in Deutschland verwendeten CBZ bis zum Jahr 2001 auf 87,6 t/a an, wovon 12% auf die Anwendung in Hospitälern fiel (BLAC, 2003).

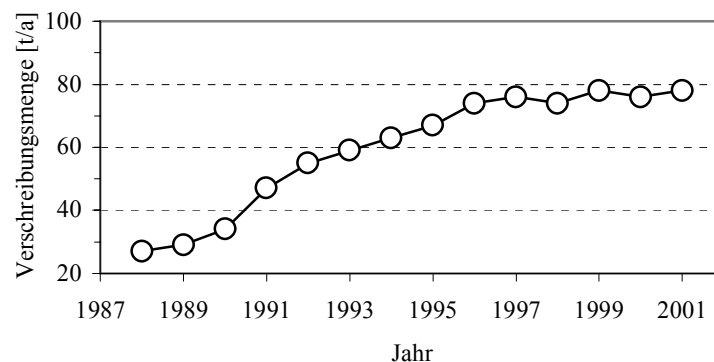


Abb. 2.1: Verschreibungsmenge [t/a] von CBZ in Deutschland zwischen 1988 und 2001, berechnet mittels der Anzahl verordneter Tagesdosen nach Schwabe & Paffrath (1998, 1999, 2003).

CBZ ist in der Umwelt sehr persistent. In Abbauprobungen mit künstlichen Wasser/Sediment-Systemen nach der Testrichtlinie OECD 308 wurden nach 100 Tagen Inkubationszeit noch über 80% der unveränderten Ausgangssubstanz nachgewiesen (Löffler et al., eingereicht Okt. 2004). In Kläranlagen wird CBZ nur sehr begrenzt eliminiert. Ternes (1998) konnte bei Messungen von Tagesmischproben von Zu- und Ablauf einer kommunalen Kläranlage während zwei Messkampagnen von jeweils 6 Tagen eine Elimination von nur 7% feststellen. Ähnliche Resultate erhielt Heberer (2002), der eine Elimination von durchschnittlich 8% feststellte. Auch in Kläranlagen mit unterschiedlichen und teilweise sehr hohen Verweildauern des Belebtschlammes (> 100 d) wurde kein signifikanter Abbau von CBZ gemessen (Clara et al., 2002, 2004, Metcalfe et al., 2003a). Obwohl in Laborversuchen nachgewiesen wurde, dass CBZ unter Einwirkung von UV-Licht bei gewissen Bedingungen einer teilweisen Photodegradation unterliegt (Andreozzi et al., 2002; Doll & Frimmel, 2003; Lam et al., 2004), konnte bei Freilandstudien eine hohe Persistenz von CBZ bestätigt werden (Tixier et al., 2003). Basierend auf Freilandmessungen berechneten Tixier et al. (2003) eine Gesamteliminationsrate für CBZ von 0,011/d, was einer Halbwertszeit $t_{1/2} = 63$ Tagen entspricht. Dies entspricht den Ergebnissen von Lam et al. (2004), die in Freiland-Mikrokosmosstudien für CBZ eine durchschnittliche Halbwertszeit von $t_{1/2} = 82$ Tagen feststellten. CBZ wurde ubiquitär in Maximalkonzentrationen im unteren $\mu\text{g/L}$ -Bereich in Abläufen von Kläranlagen, Oberflächengewässern und sogar im Grundwasser nachgewiesen (Ternes, 1998; Sacher, 1998; Ternes, 2001; Andreozzi et al., 2003; BLAC, 2003). Auf Grund der hohen Persistenz, der häufigen Verwen-

dung und des verbreiteten Vorkommens kann CBZ als Indikatorsubstanz für die Verschmutzung von Gewässern mit anthropogenen Abwässern herangezogen werden (Clara et al., 2004; Wiegel et al., 2004).

Antibiotika – Sulfamethoxazol (SMX)

Antibiotika werden zur Behandlung von Infektionskrankheiten mit dem Schwerpunkt bakterieller Infektionen eingesetzt. Einige Antibiotika finden wegen ihrer toxischen Eigenschaften Verwendung als Zytostatika in der Chemotherapie. Die Bezeichnung ‚Antibiotika‘ stammt aus dem griechischen und bedeutet ‚Gegen das Lebendige‘. Ursprünglich bezog sich der Begriff Antibiotika auf von Mikroorganismen produzierte Substanzen, die das Wachstum anderer Organismen unterdrücken. Heute werden unter diesem Begriff die natürlichen Stoffwechselprodukte und deren synthetische Nachbildungen von Bakterien, Aktinomyzeten, Pilzen, Flechten, Algen und höheren Pflanzen zusammengefasst (Alexander et al., 1995).

Mit dem zunehmenden Einsatz von Antibiotika über mehr als ein halbes Jahrhundert ist die Entwicklung bakterieller Resistenzen gegen Antibiotika zu einem weltweiten Problem geworden (Levy, 1997). Resistenz kann durch spontane Mutation des Erbgutes, oder aber durch die Weitergabe von Resistenzgenen zwischen verwandten, aber auch andersartigen Bakterien, entstehen (horizontaler Gentransfer). Da alle Antibiotika, die in der Veterinärmedizin Verwendung finden, mit Ausnahme der Pleuromutiline, mit jenen Antibiotika verwandt oder identisch sind, die in der Humanmedizin eingesetzt werden, können sie somit zur Selektion kreuz-resistenter oder co-resistenter Erreger beitragen (EMEA, 1999a).

Die wichtigsten Antibiotikagruppen sind Beta-Lactam-Antibiotika, Tetracycline, Makrolide, Chinolone und Sulfonamid(-Kombinationen). Sulfamethoxazol (SMX) ist das wichtigste Antibiotikum unter den Sulfonamiden. SMX wird meistens in Kombination mit Trimethoprim (dann auch Co-trimoxazol genannt) oder mit Tetroxoprim eingesetzt (Schwabe & Paffrath, 2000). Die Kombinationstherapie mit Co-trimoxazol wird am häufigsten bei Harnwegsinfektionen, aber auch bei Infektionen der Atemwege mit *Pneumocystis carinii* und bei Infektionen im Hals-Nasen-Ohrenbereich angewendet (<http://www.medicine-worldwide.de>). SMX wird außer in der Humanmedizin auch bei der Behandlung von kleineren Haustieren wie Hunde und Katzen eingesetzt (Campbell, 1999). Die in Deutschland verordneten Mengen von SMX unterlagen innerhalb der letzten 10 Jahre geringen Schwankungen mit einer insgesamt leicht abnehmenden Tendenz (Schwabe & Paffrath, 1998, 1999, 2003). Im Jahr 2001 wurden entsprechend den Daten des BLAC-Berichts 53,6 t SMX in Deutschland verordnet bzw. verkauft (BLAC, 2003). Auf Grund der relativ guten Wasserlöslichkeit von SMX und der schlechten Bioabbaubarkeit (Al-Ahmad et al., 1999) ist SMX wiederholt in Kläranlagenabläufen und Oberflächengewässern nachgewiesen worden (Göbel et al., 2004; Hirsch et al., 1999; Kolpin et al., 2002a; Miao et al., 2004).

Östrogene – 17 α -Ethinylöstradiol (EE2)

Die Östrogene bilden eine Gruppe der Steroidhormone, welche sich alle von dem gleichen Grundgerüst ableiten, dem Cholesterol (Coulson, 1998). Die wichtigsten Steroidhormone, die alle nur im tierischen Organismus vorkommen, sind Hormone der Nebennierenrinde (Corticosteroide, z.B. Cortisol) und die männlichen und weiblichen Geschlechtshormone (Sexualhormone), welche vorwiegend in den Keimdrüsen gebildet werden.

Östrogene sind C-18-Steroide mit einem phenolischen A-Ring, dessen Struktureigenschaften hauptsächlich für die spezifische Bindung an die Östrogenrezeptoren verantwortlich sind (Williams & Stancel, 1996). Die Östrogene sind weibliche Sexualhormone, die aus dem Testosteron in den weiblichen Keimdrüsen, sowie in geringer Menge in der Nebennierenrinde und während der Schwangerschaft auch in der Plazenta gebildet werden. Sie sind primär für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der weiblichen Geschlechtsmerkmale verantwortlich. Östrogene steuern die Ovulation und sind maßgeblich an der Kontrolle des weiblichen Zyklus beteiligt. Außerdem sind sie im Mineral-, Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsel involviert (Williams & Stancel, 1996). Die wichtigsten Östrogene sind Östron, 17 β -Östradiol und Östriol. Der therapeutische Einsatz von Östrogenen ist vielfältig, wobei der Einsatz in der Hormonersatztherapie nach der Menopause und als Kontrazeptivum die größte Bedeutung haben (Williams & Stancel, 1996).

Das synthetische Steroidhormon 17 α -Ethinylöstradiol (EE2) ist der am meisten verwendete Wirkstoff in oralen Verhütungsmitteln (Schwabe & Paffrath, 2000). EE2 ist wie die anderen Östrogene sehr lipophil und diffundiert passiv durch Zellmembranen, um daraufhin an den cytosolischen Östrogenrezeptor zu binden. In den meisten modernen Präparaten wird EE2 in Tagesdosen von 25-30 μ g/d eingesetzt, die definierte Tagesdosis DDD beträgt 25 μ g/d (WHO Collaborating Centre, 2003).

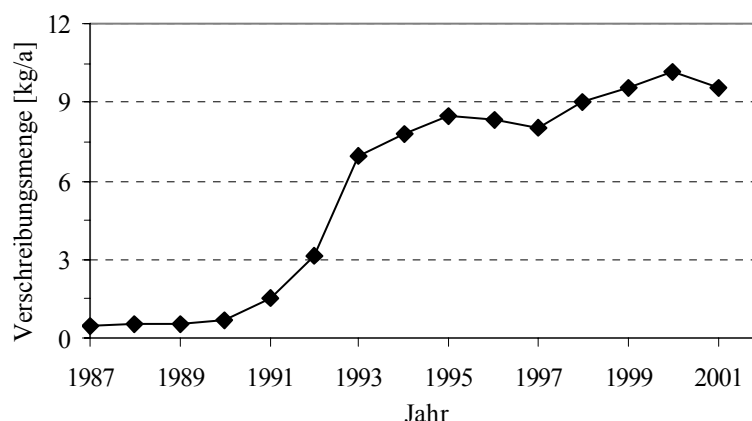


Abb. 2.2: Berechnete Verordnungsmenge von EE2 in Deutschland [kg/a] zwischen 1987 und 2001, basierend auf der Anzahl von Tagesdosen verordneter Kontrazeptiva nach Schwabe & Paffrath (1998, 1999, 2003).

Abb. 2.2 zeigt berechnete Verordnungsmengen von EE2 in Deutschland während der letzten 15 Jahre. Die Daten dieser Graphik basieren auf Verschreibungsmengen von Kontrazeptiva, die über die gesetzliche Krankenversicherung erstattungsfähig sind. Dies betrifft allerdings nur Verschreibungen von Kontrazeptiva an Frauen bis zum vollendeten 20. Lebensjahr (Schwabe, 2003, pers. Mitteilung). Deshalb kann diese Graphik nur die Tendenz der Verschreibungsmengen während des letzten Jahrzehnts wiedergeben, die absolute Verkaufsmenge im Jahr 2001 in Deutschland liegt mit 47,5 kg EE2 bei weitem höher (BLAC, 2003).

Trotz des geringen Verbrauchs wurde EE2 in Kläranlagenausläufen und Oberflächengewässern nachgewiesen (z.B. Wenzel et al., 1998; Ternes et al., 1999b; Williams et al., 2003). Auf Grund der schlechten Bioabbaubarkeit und der erhöhten Lipophilie ist EE2 potenziell bioakkumulierend, was bereits in Fisch-Bioakkumulationsstudien bestätigt werden konnte (Länge et al., 2001). Wegen des großen endokrinen Potenzials von EE2 und der Erkenntnis, dass das Steroid bereits in umweltrelevanten Konzentrationen im niedrigen ng/L-Bereich Effekte auf die Reproduktionsfähigkeit von Fischen bewirken kann (z.B. Sheahan et al., 1994; Wenzel et al., 1999), wurde während der letzten Jahre mit EE2 als repräsentativer Vertreter der endokrinen Disruptoren eine Vielzahl von Studien zu Verhalten und Wirkungen auf aquatische Organismen durchgeführt (vgl. Tab. 8.8 im Anhang).

Synthetische Moschusduftstoffe – Tonalid (AHTN)

Synthetische Moschusduftstoffe werden in Körperpflegeprodukten (z.B. Shampoos und Parfüme), aber auch in Haushaltsprodukten wie Waschpulver und Reinigungsmitteln vielfach eingesetzt. Während der letzten Jahre ist zwar ihre Anwendung in Körperpflegeprodukten insgesamt zurückgegangen (Wiegel et al., 2000), die weltweite Produktion dieser Substanzen beläuft sich jedoch auf mehrere tausend Tonnen pro Jahr (Rimkus, 1999; Geyer et al., 2000).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Arzneimittelwirkstoffen und Moschusduftstoffen (Inhaltsstoffen von Körperpflegeprodukten im Allgemeinen) ist, dass Moschusduftstoffe nicht mit der Absicht hergestellt werden, eine spezifische biologische bzw. pharmazeutische Aktivität aufzuweisen. Sollten sie dennoch einen spezifischen Wirkungsmechanismus in Organismen ausüben, so ist dieser in der Regel nicht bekannt. Ein anderer wichtiger Unterschied sind die beträchtlich höheren Produktionsmengen und die häufig daraus folgenden höheren Umweltkonzentrationen der synthetischen Moschusduftstoffe im Vergleich zu Pharmaka.

Synthetische Moschusduftstoffe werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: In Nitromoschusverbindungen (z.B. Moschus-Xylol) und in polyzyklische Moschusduftstoffe, die keine Nitrogruppen enthalten (Rimkus & Brunn, 1996). Auf Grund ihres hohen Bioakkumulationspotenzials wurden Nitromoschusverbindungen wiederholt in Biotaproben nachgewiesen (Rimkus & Wolf, 1993; Geyer et al., 1994; Rimkus & Wolf, 1995). Mehrere dieser Substanzen sind toxikologisch bedenklich; z.B. wurde Moschus-Xylol als karzinogen eingestuft (Brunn & Rimkus, 1997). In einer Kurzzeit-Studie mit transgenen Zebraäbrblingen (*Danio rerio*) wurden antiöstrogene Effekte durch die polyzyklischen Moschusduftstoffe Tonalid

(AHTN) und Galaxolid (HHCB) bei 0,1 μM (\triangleq 25,8 $\mu\text{g/L}$) beobachtet (Schreurs et al., 2004; vgl. Tab. 8.9). In einer anderen Studie wurde eine Beeinflussung des endokrinen Systems durch die Nitromoschusverbindungen Moschus-Xylol und Moschus-Keton bei Frauen festgestellt (Eisenhardt et al., 2001). Die Autoren schlossen daraus, dass reproduktionstoxische Effekte bei Frauen durch Nitromoschusverbindungen nicht ausgeschlossen werden können.

Die deutsche Industrie erklärte sich 1993 bereit, auf die Verwendung von Nitromoschusduftstoffen zu verzichten, woraufhin die Konzentrationen dieser Substanzen in der Umwelt zurückgingen (Wiegel et al., 2000). Die Anwendung mancher Nitromoschusverbindungen wurde 1995 und 1998 durch die EU-Kommission verboten; für Moschus-Xylol, Moschus-Keton und die meisten polyzyklischen Moschusduftstoffe existieren allerdings keine rechtsverbindlichen Produktionsbeschränkungen (Wiegel et al., 2000). An Stelle der zuvor verwendeten Nitromoschusverbindungen setzte die Industrie vermehrt polyzyklische Moschusduftstoffe als Ersatzsubstanzen ein (Wiegel et al., 2000). Letztere sind Indan- oder Tetralin-Derivate mit unterschiedlichen Substituenten, wozu AHTN und HHCB gehören, die im POSEIDON-Projekt näher betrachtet wurden. Diese am häufigsten eingesetzten polyzyklischen Moschusduftstoffe sind mit einem Marktanteil von ca. 95% in dieser Gruppe vertreten (van de Plassche & Balk, 1997). Die Produktionsmenge von AHTN in Europa wurde mit ca. 385 t/a angegeben (OSPAR, 2000).

Moschusduftstoffe sind sehr lipophil. Der Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient ($\log K_{ow}$) von AHTN wird mit 4,6-6,35 angegeben (EC, 2000; U.S.EPA, 2000). Van de Plassche & Balk (1997) bestimmten den $\log K_{ow}$ von AHTN experimentell auf 5,7. Entsprechend ist die Wasserlöslichkeit dieser Verbindungen sehr gering. Außerdem sind die meisten dieser Verbindungen nur schwer biologisch abbaubar. In verschiedenen standardisierten Testsystemen (28 Tage) konnte für AHTN und HHCB keine signifikante Mineralisation nachgewiesen werden (van de Plassche & Balk, 1997; Balk & Ford, 1999a).

Durch die ausgedehnte Anwendung in Haushalts- und Körperpflegeprodukten werden synthetische Moschusduftstoffe permanent über Abwässer in die Umwelt ausgebracht. Auf Grund der inhärenten Stoffeigenschaften und den über lange Zeiträume bestehenden Gebrauch wurden synthetische Moschusduftstoffe in Konzentrationen bis in den $\mu\text{g/L}$ -Bereich in Oberflächengewässern (Winkler et al., 1998; Heberer et al., 1999; Fromme et al., 2001), und im ng/L -Bereich bereits in der Nordsee nachgewiesen (Bester et al., 1998). Besorgnis erregend waren wiederholte Befunde von Moschusduftstoffen in Fischen (Eschke et al., 1994; Gatermann et al., 1999; Fromme et al., 2001) und sogar in Humanfett und Humanmilch (Liebl & Ehrenstorfer, 1993; Müller et al., 1996; Rimkus & Wolf, 1996; Zehringer & Herrmann, 2001).

Auf Grund des lipophilen Charakters binden Moschusduftstoffe auch an im Wasser vorhandene Schwebstoffe, wodurch aquatische Sedimente zur Senke dieser Substanzen werden. Dies konnte in verschiedenen Studien bestätigt werden, wobei Maximalkonzentrationen von

AHTN in Sedimenten von bis zu mehreren µg/kg TG und in Schwebstoffen von Fließgewässern bis zu wenigen mg/kg TG gemessen wurden (Balk & Ford, 1999a; Rimkus, 1999).

Für verschiedene Moschusduftstoffe wurden bereits Umweltrisikobewertungen nach dem „*Technical Guidance Document*“ (TGD) durchgeführt (z.B. Tas et al., 1997), darunter auch für AHTN (Balk & Ford, 1999b). Diese führte zu dem Ergebnis, dass ein vertretbares Risiko für aquatische Organismen durch die Exposition gegenüber AHTN indiziert war. Die Sedimenttoxizität wurde dabei mittels „*equilibrium partitioning*“ basierend auf der aquatischen Toxizität pelagischer Organismen berechnet (Balk & Ford, 1999b).

2.1.2 Auswahl der durchzuführenden ökotoxikologischen Effektstudien

Zur Auswahl der durchzuführenden Effektstudien wurde zunächst eine Literaturrecherche von Publikationen vorgenommen, welche Informationen zu Effektkonzentrationen von Pharmazeutika auf getestete Organismen enthalten. Die Recherche erfolgte mittels üblicher Datenbanken (z.B. *Current Contents*, *MedLine*) oder über im Internet verfügbare Suchmaschinen wie *Scirus* (<http://www.scirus.com>) oder *Google* (<http://www.google.de>). Diese Datenkompilation von substanzspezifischen Effektdaten (s. Kap. 8.3 im Anhang) diente als Entscheidungsgrundlage zur Durchführung eigener Effektstudien mit den ausgewählten Substanzen im Hinblick auf die Ermöglichung der Durchführung der Umweltrisikobewertungen.

Tab. 2.2: Übersicht über in der Literatur verfügbare ökotoxikologische Effektdaten (L) zu den ausgewählten Substanzen und im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Effektstudien (X) (vgl. Kap. 8.3 und Tab. 8.6-8.9 im Anhang).

Substanz	Kurzzeitstudien					Langzeitstudien				
	Alge	Daphnie	Fisch	Fisch-embryo	andere	Daphnie	Fisch	Wurm (aquat.)	andere	BC/BA ¹
CBZ	L	L	X	X/L	L	X/L	-	L	L	(L ²)
SMX	X	X	X	X	L	-	-	-	L	-
EE2	L	L	L	-	L	L	L	X	L	L/X
AHTN	L	-	-	-	L	L	L	X	L	L

¹: BC/BA = Biokonzentrations-, bzw. Bioakkumulationsstudien,

²: Bioakkumulationsstudie mit einer Grünalge (s. Tab. 8.6 im Anhang)

Zur Vervollständigung der in der Literatur verfügbaren, auf Kurzzeitstudien basierenden Effektdaten, wurden für CBZ und SMX Standardakuttests nach OECD-Richtlinien entsprechend dem Schema in Tab. 2.2 durchgeführt. Ergänzend zu den Standardtests (Algen-, Daphnien- und Fisch-Toxizität) wurden mit diesen Pharmaka Fischembryo-Akuttests in Anlehnung an das Testverfahren nach einem OECD-Richtlinienentwurf (OECD, 1998a) vorgenommen, da das Antiepileptikum CBZ fötale Schädigungen verursachen kann und deshalb während der Schwangerschaft nur unter größter Vorsicht und nach strenger Nutzen-Risiko-Abwägung verabreicht werden darf (Novartis, 2000). CBZ zeigte in einem akuten Daphnien-Toxizitätstest eine mittlere Effektkonzentration (EC₅₀) von 67,5 mg/L (Pfluger et al., 2000). In derselben

Arbeit wurden *in vitro*-Untersuchungen zur endokrinen Aktivität von CBZ bei Fischen und Fröschen durchgeführt, da die Behandlung von männlichen Ratten mit CBZ ein verringertes Prostatagewicht zur Folge hatte (zitiert in Pfluger et al., 2000). Diese Untersuchungen zeigten allerdings keine erhöhte Bindungsaffinität von CBZ zum Östrogenrezeptor von *Oncorhynchus mykiss* und *Xenopus laevis*. Zur Überprüfung der Auswirkung auf die Reproduktionsleistung von *Daphnia magna* wurde mit CBZ eine Daphnien-Reproduktionsstudie nach der OECD-Richtlinie 211 (OECD, 1998b) durchgeführt.

Für EE2 und AHTN waren bereits umfangreiche Kurzzeit- und Langzeiteffektdaten verfügbar. Beide Substanzen weisen eine große biochemische Stabilität, geringe Bioabbaubarkeit und einen hohen Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient auf (s. Tab. 8.1). EE2 wird nach der Verwendung als orales Kontrazeptivum vom Menschen hauptsächlich in konjugierter Form als Glucuronide und EE2-Sulfate mit dem Urin ausgeschieden (Guengerich, 1990) (vgl. Abschnitt 8.1.3 im Anhang). Auf diesem Wege gelangt das Hormon über das Abwasser und die kommunalen Kläranlagen in die aquatische Umwelt, wo EE2 durch bakterielle, bzw. enzymatische Aktivität zum Teil wieder freigesetzt werden kann (Adler et al., 2001). Diese Eigenschaften indizieren das Potenzial beider Substanzen, an organischem Material zu adsorbieren, z.B. an im Wasser suspendierte Partikel oder aquatischen Sedimenten, oder aber auch in Biota zu akkumulieren. Unterschiede zwischen EE2 und AHTN liegen zum einen im Produktionsvolumen, und zum anderen im endokrinen Potenzial des EE2, welches bereits im ng/L-Bereich endokrine Wirkungen auf Fische verursacht (z.B. Sheahan et al., 1994; Wenzel et al., 1999; Länge et al., 2001; vgl. Tab. 8.8 im Anhang).

Sedimente stellen eine Senke für lipophile und persistente Substanzen in der aquatischen Umwelt dar. Kontaminierte Sedimente können zu (sekundären) Quellen für die Exposition von benthischen Organismen werden (Suedel et al., 1994). Trotz der beschriebenen Eigenschaften von EE2 und AHTN liegen für diese Substanzen bisher keine Toxizitätsstudien mit sedimentbewohnenden Organismen vor. Deshalb wurden zwecks einer kompartiment-spezifischen Umweltrisikobewertung mit EE2 und AHTN ergänzend zu den vorhandenen Langzeiteffektdaten Sediment-Toxizitätsstudien mit dem benthischen Süßwasser-Oligochaeten *Lumbriculus variegatus* durchgeführt (Abschnitt 2.1.8).

Außer direkte Auswirkungen auf benthische Organismen zu verursachen, können sich lipophile Schadstoffe in Biota anreichern (Bioakkumulation). Die Bioakkumulation von Substanzen in benthischen Organismen ist insofern von Belang, da diese eine wichtige Komponente im aquatischen Nahrungsnetz darstellen. Benthische Makroinvertebraten (z.B. Würmer und Schnecken) sind Teil der Nahrungsgrundlage von vielen Sekundärkonsumenten wie Krabben, bodenlebenden Fischen oder verschiedenen Wasservögeln (Wootton, 1984; Wallace & Webster, 1994). Somit kann ein Transfer von in benthischen Organismen akkumulierten Substanzen zu Prädatoren höherer trophischer Ebenen stattfinden (Biomagnifikation) und bei diesen sekundär zu schädlichen Wirkungen, dem sogenannten „secondary poisoning“ führen.

Auf Grund des auf den physikalischen und chemischen Eigenschaften beruhenden Akkumulationspotenzials und des großen endokrinen Potenzials von EE2 sind sekundäre Effekte, verursacht durch über die Nahrungskette aufgenommenes und angereichertes EE2, durchaus möglich. In der Literatur liegen für EE2 lediglich Daten zur Biokonzentration in Fischen vor (Länge et al., 2001), nicht aber zur Bioakkumulation in benthischen Organismen. Um das Akkumulationspotenzial von EE2 in benthischen Organismen zu bewerten, wurde eine Bioakkumulationsstudie mit dem sedimentbewohnenden Oligochaeten *Lumbriculus variegatus* durchgeführt. Mit dieser Studie soll das Potenzial des benthischen Oligochaeten *L. variegatus* abgeschätzt werden, EE2 zu akkumulieren und somit einen Transfer des Hormons zu höheren trophischen Ebenen im Nahrungsnetz zu ermöglichen.

2.1.3 Algenwachstum-inhibitionstest

Testprinzip

Der Algenwachstum-inhibitionstest wurde gemäß der OECD-Richtlinie 201 (OECD, 1984a) durchgeführt. Untersucht wird die Hemmwirkung der zu testenden Substanz (SMX) auf das Zellwachstum einer einzelligen Grünalgenart im exponentiellen Wachstumsstadium in Abhängigkeit von der Prüfsubstanzkonzentration. Die Testdauer beträgt bis zu 96 h, wobei die Wirkung der Prüfsubstanz nach jeweils 24 h durch Bestimmung der Algenzell-dichte ermittelt wird. Bezüglich der Parameter Zellwachstum (b) und Wachstumsrate (r) werden die NOEC, LOEC und EC_x-Werte im Verhältnis zu Kontrollkulturen bestimmt. Zellwachstum ist dabei definiert als die Zunahme der Zelldichte über den Testzeitraum, die Wachstumsrate beschreibt die Zunahme der Zelldichte pro Zeiteinheit. Auf Grund der kurzen Generationszeit von einzelligen Algen kann der Algentest auch als chronischer Test gewertet werden, da die Testdauer mehrere Generationen umspannt.

Vortest

Zur Festlegung der zu testenden Konzentrationsstufen wurde zu Beginn ein Vortest durchgeführt. Die Prüfkonzentrationen lagen dabei zwischen 0,01 und 100 mg SMX/L mit einer Abstufung der Testkonzentrationen um den Faktor 10. Der Testorganismus und die Prüfbedingungen für den Vortest waren mit jenen im nachfolgenden Haupttest identisch, allerdings wurde keine Begleitanalytik durchgeführt. Der Vortest ließ eine Hemmung des Algenwachstums bei einer Prüfsubstanzkonzentration von 100 mg/L als einzige Effektkonzentration erkennen. Allerdings war in den restlichen Konzentrationen sowie in den Kontrollen kein 16-faches Wachstum zu erkennen, was als Qualitätskriterium definiert ist. Diesem Ergebnis zufolge wurde entschieden, den Haupttest im Konzentrationsbereich zwischen 2,5 und 100 mg/L durchzuführen.

Prüfbedingungen und Verfahren im Haupttest

Tab. 2.3 gibt eine Übersicht über die Bedingungen und Verfahren im Algenwachstum-inhibitionstest.

Tab. 2.3: Übersicht über die Testbedingungen des Algenwachstumshemmungstest mit SMX.

Testsubstanz	Sulfamethoxazol (SMX)
Testsystem	Algenwachstumshemmungstest: 96 h, statisches Testsystem
Testorganismus	Einzellige Grünalge <i>Scenedesmus subspicatus</i>
Endpunkte	NOEC, LOEC, EC _x
Biologische Parameter	Anzahl Algenzellen pro Volumeneinheit: direktes Zählverfahren (Bestimmung alle 24 h)
Auswertung der biol. Parameter	Wachstumsparameter nach 72 h und 96 h Exposition: Zelldichte, Zellvermehrung (Flächen unter den Wachstumskurven = Zellzahlintegral), Wachstumsrate
Testmedium	Artifizielles Algenmedium, vor Verwendung durch Membranfiltrierung sterilisiert
Applikation der Testsubstanz	Lösen der Testsubstanz in einer Stammlösung mit Unterstützung durch Ultraschall und Rühren
Anzahl der Testkonzentrationen	7 plus Kontrolle
Testkonzentrationen	2,5-100 mg/L (0; 2,5; 5; 10; 20; 40; 70; 100 mg/L nominal)
Anzahl der Replikate	3 je Konzentration und Kontrolle
Begleitanalytik der Testsubstanz	Zu den Zeitpunkten 0 h und 96 h aus der Kontrolle und 3 Testsubstanzkonzentrationen; Nachweismethode: LC-ESI-MS/MS
Temperatur	22 ± 1°C
Lichtintensität	7250 ± 1045 lux (Dauerlicht)
Testgefäße	300 mL-Erlenmeyerkolben mit Verschlussstopfen
Volumen der Prüflösungen	100 mL
Belüftung	keine
Zelldichte zu Testbeginn	10 ⁴ Zellen/mL
Datenauswertung	Varianzanalyse (Cochran's-Test), Mehrfachvergleich (Bonferroni t-Test), Probit-Analyse (ToxRat Professional Version 2.09, ToxRat Solutions GmbH, 2004)

Temperatur und pH des Testmediums

Die Temperatur des Testmediums wurde während der Expositionsdauer in Abständen von 10 min automatisch mit einem Data-Logger (Modell LI-1000, LI-COR, Lincoln, NE, USA) in einem zusätzlichen Testgefäß erfasst, welches unter gleichen Testbedingungen aber ohne Algenzellen geführt wurde. Der pH wurde zu Beginn und Ende des Tests im Testmedium eines Replikats je Testkonzentration mit einem pH-Meter gemessen (Modell CG 840, Schott, Mainz).

Testmedium – Stammlösung der Testsubstanz

Es wurde eine Stammlösung von 100 mg/L in Algenmedium angesetzt. Aus dieser Stammlösung wurden alle weiteren Testkonzentrationen durch Verdünnen hergestellt. Zum beschleunigten Lösen der Substanz wurde die Lösung 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend ca. 2 h bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührgerät gerührt.

Testorganismus

Die im Test verwendete Algenart war *Scenedesmus subspicatus* (CHODAT) HEGEWALD ET SCHMIDT (Chlorophyta, Chlorophyceae). Einzellige Grünalgen gehören zu den wichtigsten

Primärproduzenten in aquatischen Ökosystemen, wo sie die Basis des Nahrungsnetzes bilden. Die im Test verwendete Stammkultur wurde aus einer Festmedium-Kultur der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG 86.81) angesetzt. Das Kulturmedium, welches sowohl für den Ansatz der Flüssig-Algenkultur als auch als Testmedium verwendet wurde, entsprach dem in der verwendeten Richtlinie empfohlenen Algenmedium.

Exposition der Algenzellen

Die im Test verwendeten Grünalgenzellen stammten aus einer sich im exponentiellen Wachstum befindenden Vorkultur, welche unter Testbedingungen herangezogen wurde. Von dieser wurde zunächst die Zelldichte bestimmt und daraus das zu beimpfende Volumen errechnet, um in der Testlösung eine Zelldichte von 10^4 Zellen/mL zu erhalten. Die Testgefäße wurden nach dem Beimpfen während des gesamten Tests in einem klimatisierten Raum auf einer Schüttelvorrichtung bei einer Frequenz von ca. 105/min inkubiert, um so die Zellen in Suspension zu halten und ein Anhaften an die Gefäßwand zu verhindern.

Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte im 24 h-Rhythmus mit Hilfe eines Mikroskops bei 150-facher Vergrößerung in einer Zählkammer (Thoma-Kammer). Dabei kann über ein in der Kammer eingraviertes Raster die Zellzahl einer (falls nötig verdünnten) Algensuspension in einem definierten Volumen (z.B. 0,1 µL) gezählt und danach entsprechend auf die Zellzahl/mL umgerechnet werden. Die durchschnittliche Zelldichte wurde für jedes Replikat und jede Testkonzentration berechnet und für die Beobachtungszeitpunkte nach 72 h und 96 h Expositionszeit tabellarisch und graphisch dargestellt.

Bestimmung des Konzentrations-Wirkungsverhältnisses

Zur Bestimmung des Konzentrations-Wirkungsverhältnisses wurden zwei Verfahren verwendet:

1. Vergleich der Flächen unter den Wachstumskurven (Zellzahlintegral)

Nach Gleichung 2.1 wurde die Fläche A unter den Wachstumskurven berechnet (Auftragung der Zelldichte gegen die Zeit):

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1}) \quad [\text{Gleichung 2.1}]$$

wobei A = Fläche unter der Wachstumskurve,

N_0 = Anzahl der Zellen/mL zum Zeitpunkt t_0 (Testbeginn),

N_1 = gemessene Anzahl der Zellen/mL zum Zeitpunkt t_1 ,

N_n = gemessene Anzahl der Zellen/mL zum Zeitpunkt t_n ,

t_1 = Zeitpunkt der ersten Messung nach Testbeginn,

t_n = Zeitpunkt der n. Messung nach Testbeginn,

n = Anzahl der nach Testbeginn durchgeführten Messungen.

Daraus wurde die durchschnittliche prozentuale Hemmung des Zellwachstums I_A (Gleichung 2.2) im Vergleich zur Kontrolle nach 72 h und 96 h abgeleitet.

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100 \quad [\text{Gleichung 2.2}]$$

wobei I_A = prozentuale Hemmung des Zellwachstums,
 A_c = Fläche unter der Wachstumskurve der Kontrolle,
 A_t = Fläche unter der Wachstumskurve bei der Konzentration t .

2. Vergleich zwischen den Wachstumsraten

Nach Gleichung 2.3 wurde die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate μ der exponentiell wachsenden Kultur für jedes Replikat und jede Konzentration für die Expositionszeitpunkte 72 h und 96 h ermittelt.

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0} \quad [\text{Gleichung 2.3}]$$

wobei t_0 = Zeitpunkt zu Testbeginn.

Die prozentuale Hemmung der spezifischen Wachstumsrate bei den einzelnen Testkonzentrationen $I_{\mu x}$ wurde nach Gleichung 2.4 berechnet.

$$I_{\mu x} = \frac{\mu_c - \mu_x}{\mu_c} \times 100 \quad [\text{Gleichung 2.4}]$$

wobei μ_c = mittlere spezifische Wachstumsrate der Kontrolle,
 μ_x = mittlere spezifische Wachstumsrate bei der Testkonzentration x .

Chemische Begleitanalytik

Zur Überprüfung und Bestätigung der nominalen SMX-Konzentrationen wurden jeweils 50 mL Proben aus der Stammlösung sowie aus der Kontrolle und der niedrigsten, mittleren und höchsten Prüfkonzentration zu den Zeitpunkten 0 h und 96 h entnommen und auf die Testsubstanzkonzentration chemisch analysiert. Die Probenahme erfolgte mit Hilfe einer Glaspipette direkt aus den Testgefäßen. Die Proben wurden umgehend nach der Entnahme bei $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ in Glasflaschen eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt. Die chemische Analytik wurde am ESWE-Institut für Wasserforschung und Wassertechnologie GmbH, Wiesbaden, unter Anwendung einer von Hirsch et al. (1999) beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurden zunächst die aufgetauten Proben, basierend auf deren nominalen Konzentrationen, auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g/mL}$ in einem Phosphatpuffer verdünnt. Dieser Puffer bestand aus 20 mmol/L Dinatriumhydrogenphosphat und 20 mmol/L Kaliumdihydrogenphosphat im Verhältnis 5:4 bei pH 7,0. Je 300 μL der zu analysierenden Proben wurden in vials mit 500 ng eines Surrogat-Standards (Sulfapyridin) versetzt. Der Nachweis der zu analysierenden Substanz erfolgte mittels LC-ESI-MS/MS (Flüssigkeitschromatographie Elektro-

spray-Ionisations Tandem-Massenspektrometrie). Die Quantifizierung erfolgte unter Berücksichtigung des internen Standards mit Hilfe einer Kalibrierreihe mit den Kalibrierpunkten 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 1,5 µg/mL und 2,0 µg/mL. Die Proben der Kalibrierreihe wurden analog zu den Proben aus dem Algentest hergestellt und behandelt. Um festzustellen, ob das Algenwachstum einen Einfluss auf die SMX-Konzentration in den Testlösungen hat, wurden Parallelgefäße ohne Zugabe von Algen unter sonst identischen Versuchsbedingungen geführt und nach dem selben Schema beprobt und analysiert, wie die Proben aus den Testgefäßen des Inhibitionstests.

2.1.4 Daphnien-Toxizitätstest

Testprinzip

Der Daphnien-Toxizitätstest wurde gemäß der OECD-Richtlinie 202 (OECD, 2000b) durchgeführt. Mit diesem Test wird die Effektkonzentration einer Substanz zur Erzeugung von Schwimmunfähigkeit (Immobilisierung) bei Daphnien in Süßwasser bestimmt. Die Immobilisierung entspricht bei Daphnien in der Regel dem Tod des Organismus. Im Sinne dieser Prüfmethode wird die akute Toxizität als die mittlere Effektkonzentration (EC_{50}) zur Erzeugung der Schwimmunfähigkeit innerhalb von 48 h bei 50% der Daphnien verstanden. Dabei gelten definitionsgemäß diejenigen Daphnien als schwimmunfähig, die nach leichter Bewegung des Prüfbehälters innerhalb von 15 Sekunden keine Schwimmbewegungen zeigen. Die Prüflösungen werden während des Expositionszeitraumes nicht erneuert (statisches Verfahren). Als Testorganismen werden *Daphnia magna* oder *D. pulex* empfohlen. Die Versuchstiere dürfen bei Beginn der Exposition nicht älter als 24 h und nicht jünger als 6 h sein. Mit dem hier durchgeführten Daphnien-Toxizitätstest wurden die mittleren Effektkonzentrationen EC_x des Antibiotikums SMX zur Erzeugung von Schwimmunfähigkeit bei *Daphnia magna* bestimmt. Tab. 2.4 gibt eine Übersicht über die Bedingungen und Verfahren im Daphnien-Toxizitätstest.

Testmedium - Stammlösung der Testsubstanz

Es wurde eine Stammlösung von 160 mg/L in M4-Elendt-Medium angesetzt, welches auch zur Haltung der Tiere verwendet wird. Diese Medium enthält für Daphnien essentielle Nährelemente wie Spurenelemente, Vitamine und Makronährelemente. Die Herstellung erfolgt durch die Zugabe von Salzen und Vitaminen in deionisiertes Wasser gemäß der OECD-Richtlinie 211 (OECD, 1998b). In einem vorangehenden Test wurde nach Vorgabe der hier zu Grunde liegenden Richtlinie rekonstituiertes Wasser als Testmedium verwendet (hergestellt gemäß OECD, 1992a). Offensichtlich verursachte der Wechsel aus dem Haltungsmedium in das rekonstituierte Wasser Beeinträchtigungen auf die Daphnien bis hin zur Immobilisierung, weshalb der Test in M4-Elendt-Medium, erneut durchgeführt wurde. Ein Einfluss durch die Verwendung des Elendt-Mediums auf die Wirkung der Testsubstanz war nicht zu erwarten. Aus der so hergestellten Stammlösung wurden alle weiteren Testkonzentrationen in einer Verdünnungsreihe hergestellt. Zum Beschleunigen des Lösens der Substanz wurde die Lösung für 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend ca. 1,5 h bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührgerät gerührt.

Tab. 2.4: Übersicht über die Testbedingungen des Daphnien-Toxizitätstests mit SMX.

Testsubstanz	Sulfamethoxazol (SMX)
Testsystem	Akuter Daphnien-Toxizitätstest: 48 h, statisches Testsystem
Testorganismus	Wasserfloh <i>Daphnia magna</i>
Endpunkte	EC _x
Biologische Parameter	Immobilisierung (Mortalität)
Auswertung der biol. Parameter	Nach 24 h und 48 h Expositionsdauer, Bestimmung der Anzahl immobiler Daphnien durch Auszählen
Testmedium	M4-Elendt-Medium
Applikation der Testsubstanz	Lösen der Testsubstanz in einer Stammlösung mit Unterstützung durch Ultraschall und Rühren
Anzahl der Testkonzentrationen	6 plus Kontrolle
Testkonzentrationen	5-160 mg/L (0; 5; 10; 20; 40; 80; 160 mg/L nominal)
Anzahl der Replikate	4 je Konzentration und Kontrolle
Anzahl Daphnien pro Replikat	5
Alter der Daphnien zu Testbeginn	6-24 h
Begleitanalytik der Testsubstanz	Zu den Expositionszeitpunkten 0 h und 48 h aus der Kontrolle und 3 Testsubstanzkonzentrationen; Nachweismethode: LC-ESI-MS/MS
Temperatur	20 ± 1°C
Lichtintensität	235 ± 25 lux (16:8 h hell/dunkel-Lichtperiode)
Testgefäße	300 mL-Glaskristallisierschalen (Abdeckung mit Uhrgläsern)
Volumen der Prüflösungen	100 mL
Belüftung	keine
Fütterung während der Exposition	keine
Datenauswertung	Probit-Analyse (SPSS für Windows, Version 7.5.2G)

Testorganismus

Der Wasserfloh *Daphnia magna* STRAUS (Crustacea, Branchiopoda, Cladocera) kommt nahezu weltweit in stehenden Gewässern und Seen vor. Er ernährt sich hauptsächlich von Phyto- und Zooplankton und steht somit auf der trophischen Ebene der Primärkonsumenten. Daphnien stellen mit anderen Kleinkrebsarten einen Großteil des marinen und limnischen Planktons dar (Wehner & Gehring, 1990) und dienen wiederum Sekundärkonsumenten wie z.B. räuberischen Makroinvertebraten (z.B. Insektenlarven) und kleineren Fischen als Nahrung. Blättrige Kiemenanhänge an den Beinen dienen zur Atmung, anhängende Borsten zum Herausfiltern von Nahrung, welche den Mundwerkzeugen zugeführt und eingestrudelt wird. Daphnien vermehren sich meist parthenogenetisch in einem kurzen Generationszyklus (ca. 21 Tage). Bei ungünstigen Bedingungen (Licht, Temperatur) entstehen Männchen. Nach der Paarung werden Dauereier gebildet.

Die Haltung der Daphnien erfolgt in 2 L-Glasbechergläser mit einer Besatzdichte von 20 adulten Tieren pro Gefäß. Das Haltungsmedium, welches zweimal wöchentlich gewechselt wird, ist M4-Elendt-Medium bei einer Temperatur von 19-21°C. Die Lichtintensität in der Haltung beträgt ca. 1500 lux bei einer Photoperiode von 16:8 h hell/dunkel-Rhythmus. Nach dem Mediumwechsel werden die Daphnien mit frischen, eigens dafür gezüchteten Algenzel-

len der Grünalgenarten *Scenedesmus subspicatus* und *Pseudokirchneriella subcapitata* ad libitum und einer Suspension aus proteinhaltigen Fischtrockenfutter (TetraMin®) gefüttert.

Am Vortag des Tests wurden die Daphnien in der Haltung von den Jungtieren isoliert. So wurde sichergestellt, dass die am folgenden Tag vorhandenen Nachkommen ein maximales Alter von 18 h hatten. Die Jungtiere wurden isoliert und nach weiteren 6 h den Testlösungen exponiert. Dabei wurde mit Hilfe einer umgedrehten Pasteurpipette jedes Tier einzeln von den Haltungs- in die Testgefäße überführt.

Temperatur, pH und O₂-Gehalt des Testmediums

Wie im Algenwachstum-inhibitionstest wurde die Temperatur des Testmediums während der Expositionsdauer in Abständen von 10 min automatisch mit einem Data-Logger (Modell LI-1000, LI-COR, Lincoln, NE, USA) in einem zusätzlichen Testgefäß erfasst. Der pH und O₂-Gehalt wurde zu Beginn und Ende des Tests im Testmedium eines Replikats je Testkonzentration gemessen (pH-Meter: Modell CG 840, Schott, Mainz; O₂-Messgerät: OXI 196, WTW, Weilheim).

Auswertung

Die Anzahl immobiler Daphnien pro Replikat und Testkonzentration wurde nach 24 h und 48 h bestimmt. Hierfür wurden die Testgefäße kurzzeitig auf ein Leuchtfeld gestellt und observiert. Aus der Anzahl immobiler Daphnien pro Testkonzentration wurde die mittlere Effektkonzentration EC₅₀, sowie die 10 und 90%igen Effektkonzentrationen EC₁₀ und EC₉₀ mittels Probit-Analyse mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows, Version 7.5.2G (SPSS Inc., 1997), berechnet.

Chemische Begleitanalytik

Zur Überprüfung und Bestätigung der eingesetzten Konzentrationen wurden jeweils 50 mL Proben aus der Kontrolle und der niedrigsten, mittleren und höchsten Prüfkonzentration zu den Zeitpunkten 0 h und 48 h entnommen und auf die Testsubstanzkonzentrationen chemisch analysiert. Die Probenahme erfolgte mit Hilfe einer Glaspipette direkt aus den Testgefäßen. Die Proben wurden umgehend nach der Entnahme bei $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ in Glasflaschen eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt. Die chemische Analytik wurde wie oben beschrieben durchgeführt (s. Abschnitt 2.1.3).

2.1.5 Fisch-Toxizitätstests

Testprinzip

Die Fisch-Toxizitätstests wurden entsprechend der OECD-Richtlinie 203 (OECD, 1992a) durchgeführt. Mit diesem Test wird bei einer Expositionszeit von 96 h die akute letale Toxizität einer Substanz für Fische im Süßwasser bestimmt, wobei Mortalitäten der Testorganismen alle 24 h erfasst werden. Bei den durchgeführten Tests fand die Exposition in einem stati-

schen Testsystem statt. Die akute Toxizität wird als mittlere letale Wirkkonzentration (LC_{50}) ausgedrückt. Dies entspricht der Konzentration der Prüfsubstanz im Wasser, die 50% einer Prüfgruppe von Fischen innerhalb der angegebenen Expositionsdauer tötet. Als Prüforganismus diente der Zebraärbling *Danio rerio*, der in der Richtlinie als bevorzugte Art empfohlen wird.

Auf Grund des spezifischen Wirkmechanismus des Antibiotikums SMX wurde kein erhöhtes toxisches Potenzial gegenüber Fische erwartet, weshalb die Prüfung mit dieser Substanz als Limittest mit einer einzigen Testkonzentration von 100 mg/L und Kontrollen durchgeführt wurde. Mit dem Antiepileptikum CBZ wurde ein Vortest mit einer geringen Anzahl an Tieren und Testkonzentrationen durchgeführt. Auf Grund dessen Ergebnisse wurde der zu testende Konzentrationsbereich für den Haupttest auf 6,25-100 mg/L festgelegt. Tab. 2.5 enthält eine Übersicht über die Bedingungen und Verfahren in den Fisch-Toxizitätstests.

Testmedium - Herstellung der Testlösungen

Für beide Testsubstanzen (CBZ und SMX) wurde eine Stammlösung von 100 mg/L in rekonstituiertem Wasser entsprechend OECD (1992a) angesetzt. Zum beschleunigten Lösen von SMX wurde die Lösung 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Wasserlöslichkeit von CBZ liegt laut Literaturangaben bei 17,6 mg/L (U.S.EPA, 2000; *SRC PhysProp Database*, www.esc.syrres.com, 2004). In Löslichkeitsversuchen zeigte sich allerdings, dass die Substanz in rekonstituiertem Wasser unter Einwirkung von Ultraschall (2 x 15 min) und nachfolgendem Rühren über Nacht auch bei einer Konzentration von 100 mg/L lösbar ist.

Testorganismus

Der Zebraärbling *Danio rerio* HAMILTON-BUCHANAN zählt innerhalb der Teleostei (Knochenfische) zur Familie der Cyprinidae (Karpfenartige) und wird in verschiedenen standardisierten Prüfverfahren (z.B. OECD, 1984c; OECD, 1992b) als Prüforganismus empfohlen. Der kleinwüchsige Zebraärbling, der ursprünglich in Indien beheimat ist, hat eine Generationszeit von ca. 4 Monaten und ist leicht unter Laborbedingungen zu halten. Die in den Tests verwendeten Fische und Fischeier stammten aus der Zucht der ECT Oekotoxikologie GmbH. Das Haltungsmedium, das auch als Testmedium diente, ist rekonstituiertes Wasser. Die Haltung findet bei $26 \pm 2^\circ\text{C}$ und einer Lichtperiode von 12:12 h statt. Das Wasser wird wöchentlich gewechselt. Die Fische bekommen dreimal täglich Futter *ad libitum*, welches aus Frostfutter (verschiedene Kleinkrebse), frisch geschlüpften *Artemia* sp.-Nauplien und Fischtrockenfutter (TetraMin®) besteht; falls verfügbar werden auch frische junge Daphnien verfüttert. Die Fische für die durchgeführten Tests stammten jeweils von zur gleichen Zeit abgelegten Eiern und aus ein und demselben Haltungsbecken. Die Körperlängen der Tiere wurden vor Testbeginn durch Fotografieren und optischer Auswertung bestimmt. Ebenso vor Testbeginn wurde das Körpergewicht mit einer Analysenwaage von 10 zufällig ausgewählten Fischen bestimmt, die aus demselben Becken entnommen wurden, aus welchem die Tiere für die Tests stammten.

Tab. 2.5: Übersicht über die Testbedingungen der Fisch-Toxizitätstests mit SMX und CBZ.

Testsubstanzen	Sulfamethoxazol (SMX), Carbamazepin (CBZ)
Testsystem	Akuter Fisch-Toxizitätstest: 96 h, statisches Testsystem
Testorganismus	Zebrabärbling <i>Danio rerio</i>
Endpunkt	LC ₅₀
Biologische Parameter	Mortalität
Auswertung der biol. Parameter	Beobachtungszeitpunkte: alle 24 h; Auswertung der Mortalität nach 96 h
Testmedium	Rekonstituiertes Wasser (OECD, 1992a)
Applikation der Testsubstanz	Lösen der Testsubstanzen in einer Stammlösung mit Unterstützung von Ultraschallung und Rühren
Anzahl der Testkonzentrationen	SMX: 1 plus Kontrolle, CBZ: 5 plus Kontrolle
Testkonzentrationen	SMX: 100 mg/L nominal (Limittest), CBZ: 6,25-100 mg/L (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 mg/L nominal)
Anzahl der Replikate	1 je Konzentration und Kontrolle
Anzahl Tiere pro Replikat	10
Körperlänge der Fische zu Testbeginn	SMX: 2,4 ± 0,2 cm, CBZ: 3,0 ± 0,2 cm
Körpergewicht der Fische im Hal- tungsbecken	SMX: 152 ± 19 mg FG/Fisch, CBZ: 132 ± 34 mg FG/Fisch
Durchschnittliche Besatzdichte im Test	SMX: 760 mg/L, CBZ: 530 mg/L
Alter der Fische zu Testbeginn	SMX: 20 Wochen, CBZ: 16 Wochen
Begleitanalytik der Testsubstanzen	Zu den Expositionszeitpunkten 0 h und 96 h; SMX: Kontrolle und 1 Testsubstanzkonzentrationen, CBZ: Kontrolle und 3 Testsubstanzkonzentrationen; Nachweismethode: LC-ESI-MS/MS
Temperatur	26 ± 1°C
Lichtintensität	SMX und CBZ: 150-200 lux (12:12 h hell/dunkel-Lichtperiode)
Testgefäße	SMX und CBZ: 3 L-Vollglasaquarium
Volumen der Prüflösungen	SMX: 2 L, CBZ: 2,5 L
Belüftung	Mittels Aquarienpumpe über je eine Pasteurpipette pro Gefäß
Fütterung während der Exposition	keine
Datenauswertung	SMX: kein Effekt, CBZ: Berechnung des geometrischen Mittels zwischen zwei Kon- zentrationen (0 und 100% Effekt)

Chemische Begleitanalytik

Zur Kontrolle und Bestätigung der eingesetzten Konzentrationen wurden jeweils 50 mL-Proben aus der Kontrolle und aus der niedrigsten, mittleren und höchsten Prüfkonzentration zu den Zeitpunkten 0 h und 96 h entnommen und auf die Testsubstanzkonzentrationen chemisch analysiert. Die Probenahme erfolgte mit Hilfe einer Glaspipette direkt aus den Testgefäßen. Die Proben wurden umgehend nach der Entnahme bei $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ in Glasflaschen (SMX) und PE-Flaschen (CBZ) eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt. Die chemische

Analytik wurde unter Verwendung von LC-ESI-MS/MS als Detektionsverfahren am ESWE-Institut für Wasserforschung und Wassertechnologie GmbH, Wiesbaden, durchgeführt. Eine kurze Beschreibung des Analyseverfahrens für SMX befindet sich in Abschnitt 2.1.3. Der Nachweis von CBZ erfolgte nach einer von Ternes et al. (2001) beschriebenen Methode analog der Analyse von SMX, wobei als interner Standard 10,11-Dihydro-Carbamazepin verwendet wurde.

2.1.6 Fischembryo-Toxizitätstests

Testprinzip

Der Fischembryo-Toxizitätstest wurde in Anlehnung an einen OECD-Richtlinienentwurf (OECD, 1998a) durchgeführt. Dieser Test wurde als Alternativmethode für den Fisch-Akutttest mit adulten oder juvenilen Fischen entwickelt. Mit dem Fischembryo-Toxizitätstest werden die Mortalität, aber auch subletale Effekte (z.B. Frequenz des Herzschlages, Schlupfrate) auf Fische gemessen. Exponiert werden befruchtete Eier des Zebraärbblings (*Danio rerio*), die sich noch in einem frühen Zellstadium befinden. Effekte werden während des Expositionszeitraums von 48 h erfasst und im Vergleich zu Kontrollen ausgewertet.

Mit dem Antibiotikum SMX wurde, wie beim Fisch-Akutttest, ein Limittest mit einer Maximalkonzentration von 100 mg/L durchgeführt. CBZ wurde in den gleichen Konzentrationen getestet, wie im Fisch-Akutttest. Tab. 2.6 gibt eine Übersicht über die Bedingungen und Verfahren in den Fischembryo-Toxizitätstests.

Herstellung der Testlösungen

Für beide Testsubstanzen (CBZ und SMX) wurden am Vorabend vor Testbeginn die Stammlösungen zu 100 mg/L in rekonstituiertem Wasser angesetzt. Zum beschleunigten Lösen von SMX im Testmedium wurde die Lösung 2 x 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. CBZ wurde 3 x 15 min im Ultraschallbad behandelt und nachfolgend die Lösung ca. 1,5 h gerührt. Im Test mit SMX war die Stammlösung bereits die einzige Testlösung mit der Konzentration von 100 mg/L, die Testlösungen für den Test mit CBZ wurden durch eine Verdünnungsreihe in Konzentrationsstufen mit dem Faktor 2 aus der Stammlösung hergestellt. Um die Testlösungen auf die entsprechende Temperatur von 26°C einzustellen, wurden sie zusammen mit den benötigten Glasgeräten über Nacht im Brutschrank, in dem später die Testdurchführung stattfand, inkubiert. Dadurch wurde eine möglichst konstante Arbeitstemperatur während des Umsetzens der sensiblen Eier gewährleistet. Während der Inkubation über Nacht wurden die Testlösungen über eine Pasteurpipette mit einer Aquarienpumpe vorsichtig belüftet.

Exposition der Fischeier

Die Eiablage wird bei den Zebraärbblingen durch die Lichtperiode gesteuert. Im Labor beginnen die weiblichen Zebraärbblinge sofort nach dem Einschalten des Lichts mit dem Ablai-chen. Um die abgelaichten und befruchteten Eier aufzufangen, wurden am Abend zuvor Glas-

schalen in die Haltungsbecken gestellt. Diese waren mit einem Edelstahlnetz abgedeckt, durch welches die Eier in die Glasschalen absinken konnten, dabei aber von den Fischen getrennt blieben. Etwa eine halbe Stunde nach dem Einschalten des Lichts wurden die Glasschalen aus den Haltungsbecken herausgenommen und die Fischeier mit Hilfe eines Siebs in ein Gefäß mit rekonstituiertem Wasser überführt. Anschließend wurden je 10 bzw. 20 Eier auf eine der Menge an Replikaten entsprechende Anzahl an Petrischalen mit rekonstituiertem Wasser verteilt. Dabei wurden Eier in einem möglichst niedrigen Zellstadium ausgewählt, unbefruchtete und koagulierte Eier wurden aussortiert. Zur Überführung der empfindlichen Eier wurde eine entsprechend präparierte Pasteurpipette verwendet. Der dünne Hals der Pipette wurde im konischen Bereich abgeschnitten und die Schnittstelle über einer Flamme abgerundet. Nach dem Selektieren und Separieren der Eier wurden sie zeitgleich in die Testgefäße mit den Testlösungen überführt. Zum Zeitpunkt des Expositionsbeginns befanden sich die Eier zwischen dem 4- und 64-Zellstadium.

Tab. 2.6: Testbedingungen der Fischembryo-Toxizitätstests mit SMX und CBZ.

Testsubstanzen	Sulfamethoxazol (SMX), Carbamazepin (CBZ)
Testsystem	Fischembryo-Toxizitätstest: 48 h, statisches Testsystem (Verlängerung der Expositionsdauer auf max. 96 h)
Testorganismus	Befruchtete Eier des Zebraärblings <i>Danio rerio</i>
Endpunkte	LC _x /EC _x
Biologische Parameter	Mortalität, subletale Parameter (Herzschlagfrequenz, Schlupfrate nach 96 h Exposition)
Bestimmung der biol. Parameter	Beobachtungszeitpunkte: alle 24 h; optische Auswertung mit Hilfe eines Binokulars
Testmedium	Rekonstituiertes Wasser (OECD, 1992a)
Applikation der Testsubstanz	Lösen der Testsubstanzen im Testmedium mit Unterstützung von Ultrabeschallung und Rühren
Anzahl der Testkonzentrationen	SMX: 1 plus Kontrolle; CBZ: 5 plus Kontrolle
Testkonzentrationen	SMX: 100 mg/L nominal (Limittest), CBZ: 6,25-100 mg/L (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 mg/L nominal)
Anzahl der Replikate	SMX: 4 je Konzentration und Kontrolle, CBZ: 2 je Konzentration und Kontrolle
Anzahl Fischeier pro Replikat	SMX: 10; CBZ: 20
Alter der Eier bei Expositionsbeginn	SMX: 10-45 min (4-Zell- bis 64-Zellstadium), CBZ: 30-70 min (4-Zell- bis 64-Zellstadium)
Begleitanalytik der Testsubstanzen	Zu den Expositionszeitpunkten 0 h und 48 h; SMX: Kontrolle und 1 Testsubstanzkonzentrationen, CBZ: Kontrolle und 3 Testsubstanzkonzentrationen; Nachweismethode: LC-ESI-MS/MS
Temperatur	26 ± 1°C
Lichtintensität	220-420 lux (12:12 h hell/dunkel-Lichtperiode)
Testgefäße	300 mL-Glaskristallisierschalen, Uhrengläser als Abdeckung
Volumen der Prüflösungen	100 mL
Belüftung	keine
Datenauswertung	Signifikanztest <i>Fischer's Exact Binomial Test</i> , Probit-Analyse, R/s-Test (Normalverteilung), Cochran's-Test (Homogenität der Varianzen) (ToxRat Professional Version 2.07, ToxRat Solutions GmbH, 2003)

Auswertung biologischer Parameter

Die Fischeier wurden in regelmäßigen Abständen unter einem Binokular bei maximal 50-facher Vergrößerung observiert. Bereits nach 1,5 h fand die erste Beobachtung statt, dann wieder nach 24 h und 48 h Expositionszeit. Während jeder Beobachtung wurden mit Hilfe eines Binokulars Fotos von allen Replikaten gemacht. Die nach 24 h ausgewerteten Parameter sind das Vorhandensein der Anlage von Somiten und die Ablösung des Schwanzes vom Dottersack. Zu diesem Zeitpunkt wurden koagulierte Eier oder Embryonen ohne Somiten als letal gewertet. Nach 48 h muss bei allen Tieren der Schwanz vollständig vom Dottersack gelöst und der Herzschlag vorhanden sein, anderenfalls ist ein letaler Effekt indiziert. Als subletaler Parameter wurde nach 48 h Expositionszeit im Test mit SMX, bzw. nach 96 h Expositionszeit im Test mit CBZ, die Frequenz des Herzschlages bei je 4 zufällig ausgewählten Fischembryonen in allen Replikaten bestimmt. Hierfür wurden unter Beobachtung im Binokular die Anzahl der Herzschläge während 20 Sekunden gezählt.

Chemische Begleitanalytik

Zur Kontrolle und Bestätigung der eingesetzten Konzentrationen wurden jeweils 50 mL Proben aus der Kontrolle und aus der niedrigsten, mittleren und höchsten Prüfkonzentration zu den Zeitpunkten 0 h und 48 h entnommen und auf die Testsubstanzkonzentrationen chemisch analysiert. Die Testkonzentrationen, welche im Testverlauf beprobt wurden, wurden in entsprechend größeren Volumina angesetzt, um nach der Probenentnahme bei Expositionsbeginn in allen Testgefäßen die gleichen Volumina an Testlösungen zu erhalten. Die Probenahme erfolgte mit Hilfe einer Glaspipette direkt aus den Testgefäßen. Die Proben wurden umgehend nach der Entnahme bei $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ in PE-Flaschen eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt. Die chemische Analytik wurde unter Verwendung von LC-ESI-MS/MS als Detektionsverfahren wie oben beschrieben durchgeführt (s. Kapitel 2.1.3 und 2.1.5).

2.1.7 Daphnien-Reproduktionstest

Testprinzip

Der Daphnien-Reproduktionstest wurde gemäß der OECD-Richtlinie 211 (OECD, 1998b) durchgeführt. Das primäre Ziel dieses Tests ist die Bewertung der Wirkung einer zu prüfenden Testsubstanz auf die Reproduktionsleistung des Kleinkrebsses *Daphnia magna* STRAUS. Hierfür werden weibliche Daphnien (Elterntiere), die zu Beginn der Prüfung weniger als 24 h alt sind, der im Testmedium in verschiedenen Konzentrationen gelösten Prüfsubstanz ausgesetzt. Die Dauer der Prüfung beträgt 21 Tage. Jedes Elterntier wird dabei in einem separaten Testgefäß gehalten. Am Ende der Prüfung wird die Reproduktionsrate der Elterntiere bestimmt. Dabei werden Jungtiere, die von erwachsenen, im Verlauf der Prüfung immobilisierten Tieren stammen, von der Bestimmung der Reproduktionsrate ausgeschlossen. Die niedrigste Effektkonzentration (LOEC) und die höchste Konzentration ohne Wirkung (NOEC) auf die Reproduktionsleistung der Daphnien werden im Vergleich zu den Kontrollen bestimmt. Zusätzlich werden Effektkonzentrationen berechnet, die zu einer x-prozentigen Verringerung der Reproduktionsleistung führen (EC_x). Das Überleben der Elterntiere und die Zeit bis zur

Produktion der ersten Brut müssen ebenfalls berichtet werden. Andere substanzbedingte Wirkungen z.B. auf das Wachstum bzw. die Länge der Daphnien können ergänzend untersucht werden.

Tab. 2.7: Übersicht über die Testbedingungen des Daphnien-Reproduktionstests mit CBZ.

Testsubstanz	Carbamazepin (CBZ)
Testsystem	Daphnien-Reproduktionstest: 21 d, semi-statisches Testsystem
Testorganismus	Wasserfloh <i>Daphnia magna</i>
Endpunkte	NOEC, LOEC, EC _x
Biologische Parameter	Reproduktionsleistung (Anzahl lebender Nachkommen pro Daphnie); Körperlänge überlebender Daphnien bei Testende; Immobilität (Mortalität)
Auswertung der biol. Parameter	Tägliches Auszählen und Entfernen der Nachkommen; Vermessen der Körperlängen auf skaliertem Objektträger
Testmedium	M4-Elendt-Medium (entspricht dem Daphnien-Haltungsmedium)
Applikation der Testsubstanz	Lösen der Testsubstanz im Testmedium mit Unterstützung von Ultraschallung und Rühren
Anzahl Testkonzentrationen	5 plus Kontrolle
Testkonzentrationen	0,4-40 mg/L (0; 0,4; 1,26; 4,0; 12,6; 40 mg/L nominal)
Anzahl Replikate	12 je Konzentration und Kontrolle
Anzahl Daphnien je Replikat	1
Alter d. Daphnien bei Testbeginn	6-24 h
Alter der P-Generation bei Entnahme der juvenilen Tiere	13 d
Begleitanalytik der Testsubstanz	1 x wöchentlich aus der Kontrolle und 3 Testsubstanzkonzentrationen aus frisch angesetzten Testlösungen, sowie aus bereits im Test verwendeten Testlösungen; Nachweismethode: LC-ESI-MS/MS
Temperatur	20 ± 1 °C (klimatisierter Testraum)
Lichtintensität	233 ± 55 lux (16:8 h hell/dunkel-Lichtperiode)
Testgefäße	100 mL-Glasbecher, Uhrgläser als Abdeckung
Volumen der Prüflösungen	50 mL
Belüftung	keine
Fütterung während der Exposition	3 x wöchentlich: 0,1-0,2 mg TOC/Daphnie x d (frische Grünalgenzellen: <i>S. subspicatus</i> und <i>P. subcapitata</i>)
Datenauswertung	Nichtlineare Regressionsanalyse; Varianzanalyse (Cochran's-Test, R/s-Test, Dunnett-Test); Probit-Analyse (SPSS für Windows, Version 7.5.2G, SPSS Inc., 1997; Microsoft Excel 2000, Microsoft Corporation, 1999)

Um festzustellen, ob sich CBZ auf die Reproduktionsleistung des Kleinkrebsses *Daphnia magna* während einer langfristigen Exposition auswirkt, wurde die hier beschriebene Daphnien-Reproduktionsstudie durchgeführt. Während einer Expositionszeit von 21 Tagen wurden junge weibliche Daphnien der Testsubstanz gegenüber exponiert. Die äußeren Bedingungen im Test waren denen in der Haltung der Daphnien nahezu identisch, wobei die Daphnien mehrmals wöchentlich mit frischen Grünalgen gefüttert wurden. Tab. 2.7 gibt eine Übersicht über die Bedingungen und Verfahren im Daphnien-Reproduktionstest.

Herstellung der Testlösungen

Es wurde eine Stammlösung von 40 mg/L in M4-Elendt-Medium, welches als Haltungsmedium verwendet und als Testmedium empfohlen wird, angesetzt. Die Stammlösung entsprach der höchsten Testkonzentration, aus dieser wurden alle weiteren Testkonzentrationen durch Verdünnen hergestellt. Zum Lösen der Substanz wurde die Lösung nach kurzem Rühren 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend ca. 30 min bei Raumtemperatur mit einem Magnetrührgerät gerührt. Vor dem Ein- bzw. Umsetzen der Daphnien wurden die Lösungen zu je 50 mL auf die Testgefäße verteilt und in dem klimatisierten Testraum auf 20°C eingestellt. Das Testmedium wurde dreimal wöchentlich erneuert.

Messung der physikalischen und chemischen Parameter

Messungen des Sauerstoffgehalts, pH-Wertes und der Temperatur wurden bei jedem Mediumwechsel in den frisch angesetzten Testlösungen, bzw. in einem Replikat der bereits verwendeten und verbrauchten Testlösungen durchgeführt. Die Temperatur der frisch angesetzten Lösungen lag dabei teilweise noch etwas über der Solltemperatur, da die Stammlösung durch die Behandlung im Ultraschallbad etwas erwärmt wurde. Die Tiere wurden dann allerdings erst umgesetzt, nachdem sich die Temperatur auf ca. 20°C eingestellt hatte.

Testorganismus

Im Test wurde die in Abschnitt 2.1.4 beschriebene Kleinkrebsart *Daphnia magna* STRAUS verwendet. Die im Test verwendeten Daphnien waren nicht älter als 24 h und nicht jünger als 6 h. In der Beschreibung des Daphnien-Toxizitätstests (Abschnitt 2.1.4) wird die Separation der Daphnien der F₀-Generation von der P-Generation zur Einhaltung des vorgeschriebenen Alters erläutert.

Nahrungszugabe

Die Fütterung der Daphnien fand 3-mal wöchentlich nach jedem Mediumwechsel statt, wobei eine definierte Menge frische Grünalgenzellen (*S. subspicatus* und *P. subcapitata*) in die Testlösungen als Futter zugesetzt wurde. Die Futtermenge berechnete sich aus dem Gehalt an organischem Kohlenstoff der Algenzellen und betrug anfangs 0,15 mg C/Daphnie/d und wurde bis zum Ende des Tests auf 0,2 mg C/Daphnie/d gesteigert. Der C-Gehalt der Algenzellen wurde mit einem Kohlenstoff-Analysator (TOCOR-2, Maihak, Hamburg) bestimmt. Aus den Ergebnissen dieser Bestimmung wurde ein Nomogramm erstellt, mit welchem sich der C-Gehalt einer bestimmten Anzahl Algenzellen ablesen ließ.

Reproduktionsleistung

Ab dem 5. Tag nach Expositionsbeginn wurde täglich jedes einzelne Testgefäß auf vorhandene Nachkommen überprüft, in der Regel am späten Nachmittag. Vorhandene Jungtiere wurden mit einer Pasteurpipette aus dem Testgefäß entnommen, gezählt und verworfen. Eventuell vorhandene immobile juvenile Daphnien oder abgeworfene Eier in den Testgefäßen wurden

notiert und ebenfalls aus den Testgefäßen entfernt. Für jedes Replikat, d.h. für jede einzelne Daphnie der P-Generation, wurde die Summe aller überlebenden Nachkommen errechnet.

Bestimmung der Körperlängen

Die Körperlängen aller bis zum Testende überlebenden Daphnien wurden mit Hilfe eines 2 mm-skalierten Objektträgers bestimmt. Die Daphnien wurden in Ethanol abgetötet und anschließend auf dem Objektträger durch ein Binokular bei 20-facher Vergrößerung abfotografiert. Anschließend wurde die Länge der Daphnien (ohne Afterstachel) auf den Fotos vermessen und die Körperlänge in Relation zu dem Maßstab berechnet. Eine statistische Auswertung des Parameters Körperlänge wurde entsprechend dem für die Auswertung der Reproduktionsleistung verwendeten Verfahren durchgeführt. Die Homogenität der Varianzen wurde mit dem Cochran's-Test und dem Bartlett-Box-Test durchgeführt. Für die NOEC- und LOEC-Bestimmung bezüglich der Körperlänge wurde eine Varianzanalyse durch einen Mehrfachvergleich nach Dunnett durchgeführt.

Chemische Begleitanalytik

Zur Kontrolle der nominal eingesetzten Konzentrationen wurde einmal wöchentlich je eine Probe (50 mL) aus der niedrigsten, mittleren und höchsten Testkonzentration, sowie aus der Kontrolle, jeweils vom frisch angesetzten und vom verbrauchten Testmedium beim Mediumwechsel entnommen. Dabei wurde das Entnahmeschema derart gestaltet, dass die Proben des frisch angesetzten Mediums und die des im Test verbrauchten Mediums aus demselben Mediumansatz stammten. Das heißt, nach den Probenahmen des frisch angesetzten Mediums wurden 2 Tage später beim nächsten Medienwechsel von dem gleichen Medienansatz die Proben von im Test verbrauchten Testmedien entnommen. Die Proben wurden umgehend nach der Entnahme bei $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ in PE-Flaschen eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt. Das chemische Analyseverfahren wurde wie oben beschrieben durchgeführt (s. Kapitel. 2.1.5).

2.1.8 Sediment-Toxizitätstests

Testprinzip

Da für die hier angewendete Methode bisher keine standardisierte Richtlinie existiert, wurden die Sediment-Toxizitätstests in Anlehnung an den Chironomiden-Toxizitätstest nach dem OECD-Richtlinienentwurf 218 (OECD, 2001b) und die von Phipps et al. (1993) beschriebene Methode durchgeführt. Das Ziel des durchgeführten Tests ist die Bewertung der Wirkung einer zu prüfenden Testsubstanz auf die Vermehrung und die Entwicklung der Gesamtbio-masse von Wurmpopulationen (*L. variegatus*) in Süßwassersedimenten. Das Expositionsszenarium, welches mit lipophilen und/oder persistenten Substanzen kontaminierte Sedimente simulieren soll, besteht aus mit der zu testenden Substanz dotiertem Kunstsediment und dem Sediment überliegenden Wasser. Die Würmer sind dabei in Gruppen mit definierter Individuenzahl über einen Zeitraum von 28 Tagen dem kontaminierten Sediment und Kontrollen ohne Testsubstanz exponiert.

Vortests – „Range Finder“

Zur Findung des Bereichs der Effektkonzentrationen wurden mit beiden Substanzen sogenannte *Range-Finder*-Tests bei Konzentrationen von 0,01-100 mg/kg Sediment TG mit Konzentrationsabstufungen um den Faktor 10 durchgeführt. Für jede Konzentrationsstufe wurde je ein Replikat, für die Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen wurden je zwei Replikate geführt. Die Testbedingungen waren denen der nachfolgenden Haupttests mit geringfügigen Abweichungen in den physikalischen und chemischen Parametern identisch.

Im Vortest mit EE2 zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen eine Verringerung der Anzahl der Würmer pro Replikat in den Konzentrationen 1 und 100 mg/kg. In der dazwischen liegenden Testkonzentration von 10 mg/kg Sediment TG konnte diese Tendenz allerdings nicht bestätigt werden. Am deutlichsten zeigte sich ein Effekt bezüglich der Wurmbiomasse pro Replikat in der höchsten Testkonzentration bei 100 mg/kg, welcher allerdings nicht in den anderen Testkonzentrationen beobachtet wurde. Der zu testende Konzentrationsbereich im Haupttest mit EE2 wurde demnach auf 5 Testkonzentrationen zwischen 1 und 100 mg/kg TG mit Konzentrationsabstufungen um den Faktor 3,16 ($\sqrt{10}$) festgelegt.

Der Vortest mit AHTN ergab ein weniger einheitliches Bild. Die Vermehrung der Würmer in den Lösungsmittelkontrollen war zwar im Vergleich zu den Kontrollen deutlich reduziert, jedoch nicht die Gesamtwurmbiomasse. Von der zweitniedrigsten (0,1 mg/kg) bis zur höchsten Testkonzentration (100 mg/kg) war ein leichter aber stetiger Abfall der Anzahl der Würmer und deren Biomasse zu beobachten. Die niedrigste Testkonzentration (0,01 mg/kg) fiel jedoch mit einer sehr geringen Wurmzahl und Wurmbiomasse aus diesem Schema heraus. Im Vergleich zu den Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen unterschieden sich die Testkonzentrationen allerdings nicht wesentlich. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde entschieden, den Haupttest mit AHTN in fünf Konzentrationsstufen im Konzentrationsbereich zwischen 6,25 und 100 mg/kg durchzuführen.

Prüfbedingungen und Verfahren im Haupttest

Die Sediment-Toxizitätsstudien wurden in statischen Testsystemen durchgeführt, wobei die Sauerstoffversorgung durch Belüftung des überliegenden Wassers gewährleistet wurde. Als Nahrung für die Testorganismen diente dem Sediment beigemischtes kommerziell erhältliches Brennesselpulver (*Urtica dioica*), während des Expositionszeitraums wurde keine weitere Fütterung vorgenommen. Am Ende der Exposition wurden durch Auszählen und Wiegen der pro Testgefäß im Sediment vorhandenen Würmer die Nettoreproduktion und die Gesamtbiomasse als Endpunkte bestimmt und statistisch ausgewertet. Dabei wurden die LOEC und die NOEC sowie die mittlere Effektkonzentration (EC_{50}) für jeden beobachteten Endpunkt bestimmt. Tab. 2.8 enthält eine Übersicht über die Bedingungen und Verfahren in den Sediment-Toxizitätsstudien mit EE2 und AHTN.

Tab. 2.8: Übersicht über die Testbedingungen der Sediment-Toxizitätsstudien mit EE2 und AHTN.

Testsubstanzen	17 α -Ethinylöstradiol (EE2), Tonalid (AHTN)
Testsystem	Sediment-Toxizitätstest: 28 d, statisches Testsystem
Testorganismus	Endobenthischer Oligochaet <i>Lumbriculus variegatus</i>
Endpunkte	NOEC, LOEC, EC _x
Biologische Parameter	Reproduktion (Nettozunahme der Individuenzahl), Biomasse
Auswertung der biol. Parameter	Auszählung der Individuenzahl pro Replikat nach 28 d Exposition, Wiegen der Gesamtbiomasse pro Replikat nach 28 d Exposition
Testmedium	Artifizielles Sediment nach OECD 218 (OECD, 2001b), rekonstituiertes Wasser (OECD, 1992a) als überliegendes Medium
Applikation der Testsubstanzen	Applikation der in Lösungsvermittler (Aceton) gelösten Testsubstanzen in das Sediment, Verdampfen des Lösungsvermittlers vor der Fertigstellung des Sediments
Equilibrierungsphase des Testsystems	7 Tage, kontaminiertes Sediment mit überstehendem Wasser schüttelend bei Raumtemperatur
Anzahl der Testkonzentrationen	5 plus Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle
Testkonzentrationen	EE2: 1-100 mg/kg TG Sediment (0; 1; 3,16; 10; 31,6; 100) AHTN: 6,25-100 mg/kg TG Sediment (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100)
Anzahl Replikate	4 je Konzentration und Kontrollen; im Test mit AHTN zusätzliche Replikate zwecks Probenahme für chemische Begleitanalytik, diese zusätzlichen Replikate gingen nicht in die biol. Auswertung mit ein
Anzahl Würmer pro Replikat bei Testbeginn	10
Testgefäße	250 mL-Schraubdeckel-Gläser
Sedimentmenge pro Replikat	EE2: 90 g FG; AHTN: 80 g FG
Volumen überstehendes Wasser pro Replikat	EE2: 140 mL; AHTN: 170 mL
Verhältnis Sediment:Wassersäule	ca. 1:3,5 cm
Nahrungszugabe	<i>Urtica dioica</i> (Brennnesselpulver), 0,45% TG des Sediments
Temperatur	20 \pm 1°C
Lichtintensität	100-300 lux (16:8 h hell/dunkel-Rhythmus)
Belüftung	Permanente Belüftung des überstehenden Wassers über Pasteurpipetten mit Aquarienpumpen
Begleitanalytik der Testsubstanz	Studie mit EE2: Zu Zeitpunkten 0 d und 28 d Proben von überstehendem Wasser und Sediment (bei Testbeginn auch Porenwasser) aus den Kontrollen und 3 Testsubstanzkonzentrationen, Nachweismethode: LC-ESI-MS/MS
Datenauswertung	R/s-Test, Kolmogorov-Smirnov-Test (Normalverteilung), Cochran's-Test, Bartlett-Box-Test (Varianzhomogenität), Dunnett-Test (Varianzanalyse, Mehrfachvergleich), Probit-Analyse (SPSS für Windows, Version 7.5.2G; ToxRat Professional, Version 2.07; Microsoft Excel 2000)

Testorganismus

Der benthische Süßwasser-Oligochaet *Lumbriculus variegatus* MÜLLER (Annelida, Oligochaeta, Lumbriculidae) wurde in den Sediment-Toxizitätsstudien (und in der Bioakkumulationsstudie, vgl. Abschnitt 2.1.9) als Testorganismus verwendet. Dieser in Nordamerika und Europa beheimatete Sedimentbewohner bevorzugt die flachen Bereiche von Seen und anderen Süßgewässern, in denen er sich von Mikroorganismen und verwesenden Pflanzenmaterial ernährt (Drewes, 2001). Während sich der Wurm mit dem Kopfende im Sediment grabend auf Nahrungssuche befindet, ragt das auf den Gasaustausch spezialisierte Hinterende aus dem Sediment heraus. Eine Besonderheit dieses hermaphroditen Oligochaeten ist die Fähigkeit, sich auch durch Selbstfragmentation (Autotomie) zu vermehren. Dieser in der Laborhaltung ausschließlich beobachtete Fortpflanzungsmodus dient den Würmern in ihrer natürlichen Umgebung außerdem zur Verteidigung, da sich die Würmer bei leichtem Druck auf den Körper oder bei Verletzungen reflexartig in zwei oder mehrere Fragmente teilen können, die dann in einer raschen Regenerationsphase einen neuen Kopf, ein neues Hinterende oder beides ausbilden (Drewes, 2001). *L. variegatus* ist als Testorganismus für Sediment-Toxizitäts- und Bioakkumulationsstudien sehr gut geeignet (Phipps et al., 1993): Er repräsentiert eine ökologisch relevante Komponente oder Artengruppe in Süßwasser Ökosystemen (die Oligochaeten), welche ubiquitär in benthischen Habitaten verbreitet ist. *Lumbriculus* ist außer zur Auswertung von akuter Mortalität bei Toxizitätsstudien geeignet, subletale Parameter wie Wachstum und Reproduktion zu erfassen, da er bezüglich dieser Endpunkte sensitiv gegenüber Umweltchemikalien und pharmakologischen Wirkstoffen reagiert (Drewes, 2001). Außerdem ist er im Labor einfach zu handhaben und zu kultivieren (Drewes, 1996). Er ist allen wichtigen Expositionswegen ausgesetzt, d.h., durch Kontakt mit Wasser, Porenwasser und Sediment ist die Aufnahme von Substanzen über die Körperoberfläche, aber auch über die Darmwand durch Ingestion von kontaminierten Partikeln, möglich (Phipps et al., 1993). Leppänen & Kukkonen (1998) fanden heraus, dass letztgenannter quantitativ der wichtigste Expositionspfad darstellt. *L. variegatus* erreicht zudem eine ausreichende Biomasse zur Durchführung von Sediment-Bioakkumulationsstudien.

Die für die durchgeführten Studien verwendeten Tiere stammten aus der Zucht der ECT Oekotoxikologie GmbH. Die Würmer werden in 3,5 L-Glasschalen in einer etwa 2 cm hohen Schicht aus reinem Quarzsand mit rekonstituiertem Wasser als überstehendes Medium gehalten. Die Fütterung erfolgt zweimal wöchentlich mit einer Suspension von fein gemahlenem Fischtrockenfutter (TetraMin®).

Synchronisation der Population

Vor ihrer Verwendung in den Tests wurden die Würmer synchronisiert, indem sie mit einem Skalpell in der Mitte ihres Körpers geteilt wurden (Brust et al., 2001). Auf Grund der Regenerationsfähigkeit von *L. variegatus* ist dieser Organismus in der Lage, innerhalb kurzer Zeit verlorene Segmente zu erneuern. Da die Würmer in der Zucht über längere Zeit in den Haltegefäßen verweilen, sind Tiere von unterschiedlichem Alter und Größe in ein und demselben Gefäß vorhanden. Die Synchronisation soll eine Angleichung des physiologischen Zu-

stands der Individuen und dadurch eine Herabsetzung der Varianz der beobachteten Endpunkte bewirken. Nach der Teilung der Würmer wurden Vorder- und Hinterenden separat in Halungsgefäße überführt. Im Test wurden nur Würmer verwendet, welche sich aus den Hinterenden regeneriert hatten. Neun Tage nach der Teilung hatten die meisten Wurmhinterenden bereits neue Vorderenden ausgebildet und begannen, sich im Quarzsand einzugraben. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Würmer zum ersten Mal mit einer Brennesselpulversuspension gefüttert.

Herstellung des Kunstsediments

Das in den Tests verwendete Kunstsediment wurde nach dem OECD-Richtlinienentwurf 218 (OECD, 2001b) hergestellt. Die einzige Abweichung war die Zugabe von ca. 0,45% TG Brennesselpulver als Nahrungs- und Stickstoffquelle für die Würmer während des Expositionszeitraumes. Während der Tests wurde sonst keine weitere Fütterung vorgenommen. Tab. 2.9 enthält eine Übersicht über die Zusammensetzung des Kunstsediments.

Tab. 2.9: Zusammensetzung des Kunstsediments.

Bestandteil	Anteil am Sediment-TG [%]	Eigenschaften
Quarzsand	75	Feinsandanteil (Korngröße 0,05-0,2 mm) > 80%
Kaolin	20	Kaolinitanteil ≤ 30%
Torf	4,55	Handelsüblicher Torf, fein gemahlen
Brennesselpulver	0,45	Gemahlen (aus Reformhandel)
CaCO ₃	< 0,01	Pulverisiert, chemisch rein
Demineralisiertes Wasser	46	Leitfähigkeit ≤ 10 µS/cm

Zunächst wurde der Torf mit einem Häcksler zerkleinert (Korngröße max. 0,5 mm). Um eine Suspension des Torfmehls und dem Brennesselpulver herzustellen, wurden diese Bestandteile mit 80% des Gesamtwassergehalts des fertigen Sediments versetzt und mit einem Ultra Turrax (T 25, Janke & Kunkel, Staufen) homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension mit CaCO₃ auf pH 5,5 ± 0,5 eingestellt und 3 Tage unter langsamem Rühren bei Raumtemperatur konditioniert, um die Torfpartikel quellen zu lassen. Dadurch wurde ein stabiler pH-Wert erreicht und eine stabile mikrobielle Fauna konnte sich etablieren. Nach dieser Konditionierung wurde die Suspension erneut mit CaCO₃ auf pH 6,0 ± 0,5 eingestellt. Anschließend wurde das Kaolin (Amberger Kaolinwerke, Hirschau), das restliche Wasser und der Quarzsand (Typ F36, Quarzwerke Frechen GmbH, Frechen) zugegeben; ca. 10% des Quarzsandes wurden für die Applikation der Testsubstanzen zurückgehalten. Das fertige Sediment hatte im Test mit EE2 einen pH-Wert von 6,4 und im Test mit AHTN von 6,5.

Herstellung der Applikationslösungen, Applikation des Sediments

Zunächst wurden Stammlösungen der Testsubstanzen in Aceton (99,5% p.a.) als Lösungsvermittler hergestellt. In Verdünnungsreihen wurden aus den Stammlösungen Applikationslösungen hergestellt, die so berechnet wurden, dass jeweils 9,4 mL pro Konzentrationsstufe

appliziert werden konnten, um die nominalen Testkonzentrationen zu erreichen. Die Applikationslösungen wurden auf jeweils 40 g trockenen Quarzsand in Glaspetrischalen appliziert, so dass der Sand vollständig benetzt war. Zum Verdampfen des Lösungsmittels wurde der kontaminierte Quarzsand für ca. 3 h unter einen Abzug gestellt und gelegentlich mit einem Edelstahlspatel vorsichtig aufgemischt. Anschließend wurde der kontaminierte und getrocknete Quarzsand mit der entsprechend pro Konzentrationsstufe benötigten Menge vorbereiteten Sediments vermischt.

Inkubation des Sediments

Die Inkubationsgefäße enthielten die gesamte Menge an Sediment, die für jeweils eine Konzentrationsstufe benötigt wurde (320 bzw. 460 g FG Sediment). Nach gleichmäßigem Vermengen des fertigen Sediments wurde vorsichtig die entsprechende Menge rekonstituiertes Wasser aufgefüllt. Die Gefäße wurden abgedeckt und bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ruhend für 48-72 h inkubiert. Nach der ruhenden Inkubation wurden die Gefäße fest verschlossen und auf einer Schüttelvorrichtung mit einer Frequenz von ca. 120/s bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$ eine Woche lang im Dunkeln geschüttelt. Diese Behandlung sollte ein Verteilungsgleichgewicht der Testsubstanzen zwischen den Kompartimenten des Testsystems bewirken. Nach dieser Behandlung wurden die Testgefäße für weitere 4-5 Tage ruhend bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubiert.

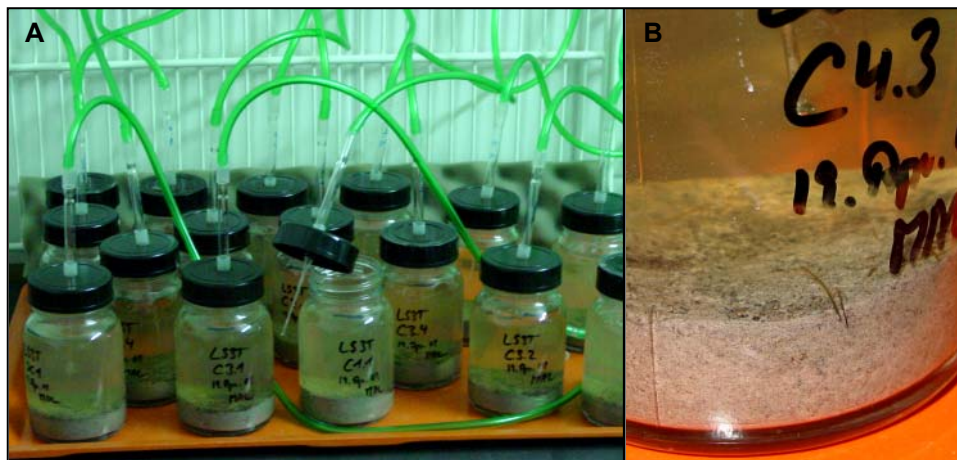


Abb. 2.3: Testgefäße in den Sediment-Toxizitätstests. A Anordnung der Testgefäße; im Deckel eines geöffneten Gefäßes ist die Pipette zur Belüftung des überstehenden Wassers zu sehen; B Ausschnitt eines Testgefäßes der Konzentrationsstufe 50 mg/kg im Test mit AHTN nach 28 d Expositionszeit; zu erkennen sind zwei Würmer deren Hinterenden in das Wasser ragen.

Vorbereitung der Testgefäße

Nach der beschriebenen Vorbereitung des Sediments wurde zunächst das überstehende Wasser abgesaugt und zur Seite gestellt. Das Sediment wurde dann manuell mit einem Edelstahlspatel homogenisiert und zu gleichen Anteilen auf die 250 mL-Testgefäße verteilt. Anschließend wurde das überstehende Wasser vorsichtig in entsprechender Menge über das Sediment gegeben. Der Wasserpegel wurde mit einem Stift an den Gefäßen markiert, um später eventu-

ell auftretenden Wasserverlust durch Verdunstung mit demineralisiertem Wasser ausgleichen zu können. Die Testgefäße enthielten schließlich 90 bzw. 80 g FG Sediment und jeweils 140 mL bzw. 170 mL überstehendes Wasser im Test mit EE2 bzw. mit AHTN. Nach 24 - 48 h, nachdem sich vom Sediment suspendierte Schwebstoffe aus dem Wasser teilweise wieder abgesetzt hatten, wurde jedes Testgefäß über eine Pasteurpipette mittels einer Aquariumpumpe vorsichtig belüftet. Die Pipette ragte dabei durch ein kleines Loch im Plastikschraubverschluss der Gefäße bis 1,5-2 cm über der Sedimentoberfläche (Abb. 2.3-A).

Probenahme von überstehendem Wasser, Porenwasser und Sediment

Zur Überprüfung der nominalen Testkonzentrationen wurden am Tag 0 des Expositionszeitraums kurz vor Expositionsbeginn der Würmer Proben von überstehendem Wasser, Porenwasser und Sediment aus je einem Replikat der Kontrollen, der niedrigsten, mittleren und höchsten Testkonzentration entnommen und chemisch analysiert. Jeweils 40 mL des überstehenden Wassers wurden mit Hilfe einer Glaspipette direkt aus den Testgefäßen entnommen und in Glasflaschen abgefüllt. Danach wurde das restliche überstehende Wasser vorsichtig mit einer Saugpumpe abgesaugt und beiseite gestellt. Nach dem Absaugen des Wassers wurden 40 g FG Sediment mit einem Edelstahlspatel entnommen. Zur Trennung von Sediment und Porenwasser wurden die Proben 30 min bei 4°C und 9425 g zentrifugiert. Das so erhaltene Porenwasser wurde abdekantiert (ca. 2-3 mL) und in kleinen Glasfläschchen mit den Proben des überstehenden Wassers bei ca. -18°C bis zur Analyse aufbewahrt. Das verbliebene Sediment (ca. 36 g) wurde den Zentrifugenröhrchen entnommen und in Plastikschaalen bei ca. -18°C tiefgefroren. Nach den Probenahmen bei Testbeginn wurde das zuvor abgesaugte überstehende Wasser wieder vorsichtig über das Sediment gegeben. Bei Testende am Tag 28 konnte auf Grund des Verfahrens bei der Auszählung der Würmer zu diesem Zeitpunkt kein Porenwasser beprobt werden, sondern das Sediment wurde als gesamtes beprobt und analysiert.

Exposition der Testorganismen

Nach der ruhenden Inkubation der fertigen Sedimente wurde zwei Tage nach dem Beginn der Belüftung des überstehenden Wassers die Exposition gestartet. Vor dem Einsetzen der Würmer in die Testgefäße wurden die physikalischen und chemischen Parameter des überstehenden Wassers in allen Replikaten gemessen, sowie die Proben für die chemische Begleitanalytik entnommen. Die Höhe der Sedimentschicht lag nach der Probenentnahme bei ca. 1,5 cm, die Wassersäule hatte eine Höhe von ca. 5 cm. Die synchronisierten Würmer wurden aus dem Haltungsgefäß entnommen und randomisiert in Gruppen zu 10 Tieren auf mit rekonstituiertem Wasser gefüllte Petrischalen verteilt. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur solche Würmer verwendet wurden, die bereits ein vollständiges neues Kopfbild ausgebildet, aber noch keine neue Teilung im hinteren Teil vollzogen hatten. Anschließend wurden die Würmer auf die Testgefäße verteilt. Beim Einsetzen der Würmer wurde die Belüftung des überstehenden Wassers kurzzeitig ausgeschaltet. Bei Expositionsbeginn waren die synchronisierten Würmer im Test mit EE2 16 Tage und im Test mit AHTN 19 Tage alt.

Auszählung der Testorganismen

Bei Testende wurde nach der Probenentnahme das Sediment zusammen mit dem verbliebenen überstehenden Wasser in den Testgefäßen vorsichtig aufgeschüttelt. Der gesamte Inhalt wurde über ein Kunststoffsieb abgossen und so die Würmer vom Sediment getrennt. Die Würmer wurden in Petrischalen mit rekonstituiertem Wasser überführt, gezählt und in verschiedene Kategorien eingeteilt. Dabei wurde unterschieden zwischen

1. adulten Würmern, die sich während des Expositionszeitraums nicht geteilt hatten,
2. Würmern, die ein neues Vorder- oder Hinterende ausgebildet hatten,
3. Würmern, die beide Enden neu ausgebildet hatten, und
4. Gesamtzahl der Würmer pro Replikat, die irgendeine Teilung aufwiesen.

Schließlich wurde die Gesamtzahl aller Würmer jedes Replikats bestimmt. Die mittlere Effektkonzentration EC_{50} wurde mittels logistischer Regressionsberechnung mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows, Version 7.5.2G (SPSS Inc., 1997) ermittelt und mit Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, 1999) graphisch dargestellt.

Bestimmung der Biomasse

Nach der Auszählung wurden die Würmer je Replikat in ca. 3 mL Ethanol abgetötet, über Nacht bei ca. 105°C getrocknet und nach dem Abkühlen im Exsikkator mit einer Analysenwaage gewogen. Mittels Division des Gesamtrockengewichts durch die Gesamtzahl der Würmer pro Replikat ließ sich die durchschnittliche Biomasse pro Wurm errechnen.

Chemische Begleitanalytik

Eine chemische Analyse der Testmedien fand lediglich im Versuch mit EE2 statt, da für AHTN keine Methode zur Bestimmung der Substanz im Sediment zur Verfügung stand. Die chemische Analytik wurde nach einer Methode von Ternes et al. (1999b) unter Verwendung von LC-ESI-MS/MS als Detektionsverfahren an der Bundesanstalt für Gewässerschutz, Koblenz, durchgeführt. Die Bestimmungsgrenzen bei dem angewendeten Verfahren lagen bei 0,5 ng/L für wässrige Proben und bei 0,5 ng/g TG bei Proben des Sediments.

TOC-Bestimmung des Sediments

Im Sediment-Toxizitätstest mit AHTN wurden bei Testende Sedimentproben entnommen und deren Anteil an organischem Kohlenstoff (TOC) bestimmt. Hierzu wurden Proben aus denselben Replikaten entnommen, aus denen auch die Proben für die chemische Begleitanalytik genommen wurden. Die TOC-Bestimmung wurde gemäß DIN 38414 (DIN, 1985) durchgeführt. Die getrockneten Proben wurden zunächst mit 4-molarer HCl überschichtet, um carbonatgebundenen Kohlenstoff aus der Probe zu entfernen. Nach erneuter Trocknung und Wiegen der Proben wurden sie bei $550 \pm 10^\circ\text{C}$ in einem Muffelofen verascht. Bei der Berechnung des Glühverlusts der Proben wurde der Kristallwasseranteil des im Sediment enthaltenen Kaolins sowie der Faktor von 1,72 angewendet, um weitere flüchtige Probenbestandteile (z.B. gebundenen Stickstoff) zu berücksichtigen. Der so festgestellte TOC betrug $3,2 \pm 0,5\%$ des Sedimenttrockengewichts ($n = 4$).

2.1.9 Sediment-Bioakkumulationsstudie

Testprinzip

Um das Potenzial zur Anreicherung von EE2 in benthischen Organismen zu bewerten, wurde die Sediment-Bioakkumulationsstudie nach der von Egeler et al. (1999, 2000) beschriebenen Methode durchgeführt. Das Verfahren wurde von den Autoren im Format eines OECD-Richtlinienentwurfs eingereicht.

Als Testorganismus diene, wie bei den Sediment-Toxizitätsstudien, der endobenthische Oligochaet *Lumbriculus variegatus*. Ebenso wie für die Sediment-Toxizitätsstudien wurden die Würmer vor der Verwendung synchronisiert (vgl. Abschnitt 2.1.8). Als Testmedium diene entsprechend den Sediment-Toxizitätsstudien ein definiertes künstliches Sediment, in welches die Prüfsubstanz eingemischt wurde und rekonstituiertes Wasser als überstehendes Medium. Um während der Exposition durch die Testsubstanz bedingte toxische Effekte auf die Würmer zu vermeiden, wurde diese in einer geringst möglichen Konzentration eingesetzt. Aus diesem Grund wurde in der durchgeführten Studie ^{14}C -markiertes EE2 als Testsubstanz verwendet. Die radioaktive Markierung der Substanz ermöglicht es, mittels ‚Radiotracer‘-Technik und Szintillationszählung sehr geringe Substanzmengen in kleinen Probenvolumina nachzuweisen.

Die Bioakkumulationsstudie ist in zwei Phasen geteilt. In einer ersten Akkumulationsphase sind die Würmer kontaminierten Sedimenten ausgesetzt, während dessen in definierten Abständen Proben von Würmern, Wasser und Sediment entnommen und deren Gesamtradioaktivität bestimmt wird. Zu Beginn der nachfolgenden Eliminationsphase werden zuvor exponierte Würmer in kontaminationsfreies Sediment überführt, wobei wiederum die Gesamtradioaktivität in allen Kompartimenten in bestimmten Abständen gemessen wird. Somit kann eine Akkumulations- und Eliminationskinetik der in den Würmern angereicherten und wieder eliminierten Substanz berechnet werden.

Der zu bestimmende Endpunkt ist der (Bio-)Akkumulationsfaktor (B)AF. Dieser beschreibt das Verhältnis der in den Würmern angereicherten Gesamtradioaktivität zur Gesamtradioaktivität im Sediment am Ende der Aufnahmephase, bzw. im „*steady state*“, welches im besten Fall während der Akkumulationsphase erreicht wird. Das *steady state* beschreibt ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme- und gleichzeitig auftretenden Eliminationsprozessen, d.h. die Nettoanreicherung im Wurm ist 0. In der OECD-Richtlinie 305 zur Durchführung von Fisch-Biokonzentrationsstudien (OECD, 1996) gilt das *steady state* als erreicht, wenn die Abweichung dreier aufeinander folgender Konzentrationsmessungen nicht mehr als $\pm 20\%$ beträgt. Die Testbedingungen und Verfahrensparameter sind in Tab. 2.10 zusammengefasst.

Tab. 2.10: Übersicht über die Testbedingungen der Sediment-Bioakkumulationsstudie mit EE2.

Testsubstanz	¹⁴ C-17 α -Ethinylöstradiol (¹⁴ C-EE2), spezifische Radioaktivität: 5,54 MBq/mg
Testsystem	Sediment-Bioakkumulationsstudie: 35 d Akkumulationsphase, 10 d Eliminationsphase; statisches Testsystem
Testorganismus	Endobenthischer Oligochaet <i>Lumbriculus variegatus</i>
Endpunkte	(Bio-)Akkumulationsfaktor (B)AF: Verhältnis der in den Würmern angereicherten Gesamtradioaktivität zur Gesamtradioaktivität im Sediment am Ende der Aufnahmephase; Verhältnis der Gesamtradioaktivität in den Würmern am Ende der Eliminationsphase zur angereicherten Gesamtradioaktivität am Ende der Aufnahmephase
Biologische Parameter	Akkumulations- und Eliminationskinetik im Wurmgewebe, Anteil der Ausgangssubstanz an akkumulierter Gesamtradioaktivität
Auswertung der biol. Parameter	Messung der Gesamtradioaktivität in den Würmern mittels Flüssig-Szintillationszählung („ <i>Liquid Scintillation Counting</i> “), Dünnschichtchromatographie mit Wurmextrakten
Testmedium	Artifizielles Sediment nach OECD 218 (OECD, 2001b), rekonstituiertes Wasser (OECD, 1992a) als überliegendes Medium
Applikation der Testsubstanz	Applikation der in Lösungsvermittler (Aceton) gelösten Testsubstanzen in das Sediment, Verdampfen des Lösungsvermittlers vor der Fertigstellung des Sediments
Anzahl der Testkonzentrationen	1 plus Kontrolle
Testkonzentration	300 ng EE2/g FG (556 ng EE2/g TG), entsprechend 100.000 dpm/g FG
Testgefäße	100 mL-Rollrandgläser (kleine Testgefäße), 1 L-Einmachgläser (große Testgefäße)
Anzahl Replikate	kleine Testgefäße: 8 Kontrollen, 52 kontaminierte Replikate; große Testgefäße: 4 Kontrollen, 4 kontaminierte Replikate
Sedimentmenge pro Replikat	kleine Testgefäße: 26 g FG, große Testgefäße: 260 g FG
Volumen überstehendes Wasser pro Replikat	kleine Testgefäße: 60 mL FG, große Testgefäße: 600 mL FG
Anzahl Würmer pro Replikat bei Testbeginn	10
Nahrungszugabe	<i>Urtica dioica</i> (Brennnesselpulver), 0,45% TG des Sediments
Temperatur	20 \pm 2°C
Lichtintensität	100-300 lux (16:8 h hell/dunkel-Rhythmus)
Belüftung	Permanente Belüftung des überstehenden Wassers über Pasteurpipetten mittels Aquarienpumpen
Datenauswertung	Anpassung der Akkumulationsfaktoren an Aufnahme- und Eliminationskurven durch nichtlineare Regressionsanalyse (Ein-Kompartiment-Modell) (SPSS für Windows, Version 7.5.2G; Microsoft Excel 2000)

Sediment

Die Herstellung des Sediments und die Durchführung dieser Studie fanden in einem Isotopenlabor (Labor-Sicherheitsbereich) statt, da die Studie mit einer radioaktiv markierten Substanz durchgeführt wurde. Das artifizielle Sediment enthielt die gleichen Bestandteile wie in den Sediment-Toxizitätsstudien und wurde nach dem gleichen Verfahren hergestellt, wie in Abschnitt 2.1.8 beschrieben, mit dem Unterschied, dass es nicht schüttelnd, sondern ruhend für eine Zeit von 4 Tagen vor der Exposition der Würmer inkubiert wurde. Das Sediment wurde mit deionisiertem Wasser auf 46% Wassergehalt und mit CaCO_3 auf pH 7 eingestellt. Für die Untersuchung der Akkumulations- und Eliminationskinetik wurden 100 mL-Glasröhrchen (kleine Testgefäße) mit ca. 3,4 cm Durchmesser verwendet. Zwecks einer dünnschichtchromatographischen Analyse (DC) von Extrakten aus Wurmgewebe wurden acht große Testgefäße (1 L) mit einer entsprechend größeren Menge an Würmern eingesetzt.

Testsubstanz und Applikation

Die Testsubstanz, das ^{14}C -markierte 17α -Ethinylöstradiol, wurde freundlicherweise von der Schering AG, Berlin, zur Verfügung gestellt. Gelöst in Ethanol hatte es laut Herstellerangaben eine spezifische Radioaktivität von 5,54 MBq/mg bei einer radiochemischen Reinheit von $> 99\%$. Das Molekül war an den C-Atomen der Ethinylgruppe radioaktiv markiert (Abb. 2.4).

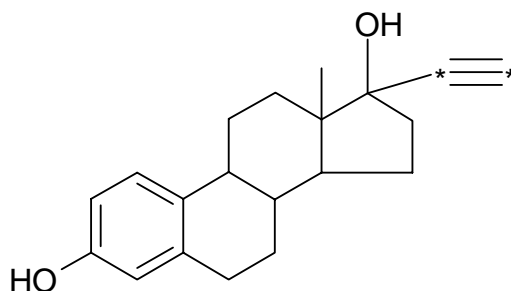


Abb. 2.4: Chemische Struktur von ^{14}C - 17α -Ethinylöstradiol; die beiden radioaktiv markierten Atome sind mit * gekennzeichnet.

Die nominale Konzentration wurde auf 300 ng EE2/g Sediment FG, bzw. 556 ng EE2/g Sediment TG eingestellt, was 100.000 dpm/g Sediment FG entsprach. Diese Konzentration wurde mit der Absicht festgelegt, bei einem hypothetischen Akkumulationsfaktor von 1 noch in 1 g Biota potenzielle Metabolite, die zu einem Anteil von 10% der Ausgangssubstanz gebildet würden, mit der dünnschichtchromatographischen Methode und einem radiographischen Lesegerät detektieren zu können. Die zuvor durchgeführten Sediment-Toxizitätsstudien mit unmarkiertem EE2, bei denen die subletalen Parameter Biomasse und Reproduktion untersucht wurden, ergaben eine $\text{NOEC} = 31,6 \text{ mg/kg Sediment TG}$, also $31,6 \mu\text{g/g TG}$ (vgl. Abschnitt 0). Somit war vorauszusetzen, dass die in der Bioakkumulationsstudie eingesetzte Konzentration von 300 ng EE2/g TG, die um zwei Größenordnungen niedriger lag als die zuvor bestimmte NOEC, keine toxischen Effekte auf die Würmer hervorrufen würde.

Wie in den Sediment-Toxizitätsstudien erfolgte die Applikation der in Aceton gelösten Testsubstanz auf einen kleinen Anteil des trockenen Quarzsands. Nachdem das Aceton vollständig verdampft war, wurde der dotierte Sand mit den anderen Sedimentbestandteilen sorgfältig vermischt. Vor dem Vermischen wurden drei Proben zu je 1 g TG aus dem Sand entnommen, um darin die Radioaktivität zu bestimmen und somit die nominale EE2-Konzentration zu überprüfen. Die Radioaktivitätsmessung (siehe unten) wurde nach der Fertigstellung des Sediments mit jeweils 3 Proben zu 1 g FG wiederholt.

Trockengewicht- und Lipidgehalt der Würmer

Das Trockengewicht und der Lipidgehalt wurden in Teilproben der Würmer aus den Kontrollen am Ende der Aufnahmeperiode bestimmt. Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden aus den 4 Replikaten der Kontrollen je eine Probe von 0,1-0,2 g FG Würmer entnommen, auf einem leicht angefeuchteten Papiertuch abgetupft und gewogen. Danach wurden die Proben über Nacht (ca. 12 h) im Trockenschrank bei 105°C getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurden die Proben erneut gewogen und das Trockengewicht errechnet.

Der Lipidgehalt der Würmer wurde nach einer Methode von Smedes (de Boer et al., 1999) gravimetrisch bestimmt. Hierzu wurden insgesamt 4 Teilproben von ca. 0,4-0,6 g FG aus den 4 Replikaten der Kontrollen entnommen, mit je 16 mL 2-Propanol und 20 mL Cyclohexan versetzt und anschließend mit einem Ultra-Turrax (T 25, Janke & Kunkel, Staufen) bei ca. 10.000 U/min homogenisiert. Nach der Zugabe und wiederholter Homogenisierung mit einer definierten Menge deionisierten Wassers wurden die Proben 5 min bei 715 g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere organische Phase abgezogen und in ein geeignetes Eindampfgefäß überführt. Daraufhin wurde das Wurmhomogenat erneut mit 20 mL Cyclohexan/2-Propanol (87:13 v/v) versetzt, homogenisiert, zentrifugiert und die organische Phase abgezogen. Die beiden cyclohexanischen Extrakte wurden vereint und im N₂-Strom bis auf 3 mL eingeeengt. Das Extrakt wurde in einen ausgeheizten und zuvor abgewogenen 10 mL-Kolben überführt, das Eindampfgefäß mit ca. 3 mL Cyclohexan/2-Propanol (87:13 v/v) gespült und zu dem Extrakt zugefügt. Das Extrakt wurde nun im N₂-Strom bis zur Trockne eingedampft und danach bei 105°C getrocknet. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde der 10 mL-Kolben gewogen und aus der Gewichts Differenz zum leeren Kolben der Lipidgehalt berechnet und auf das Trockengewicht normalisiert.

TOC-Bestimmung des Sediments

Der Gehalt an organischem Kohlenstoff (TOC) im Sediment wurde in 5 Stichproben von ca. 5-7 g FG aus Kontrollsediment vor dem Einsetzen der Würmer bestimmt. Die Bestimmung wurde nach der gleichen Methode durchgeführt, wie in Abschnitt 2.1.8 beschrieben.

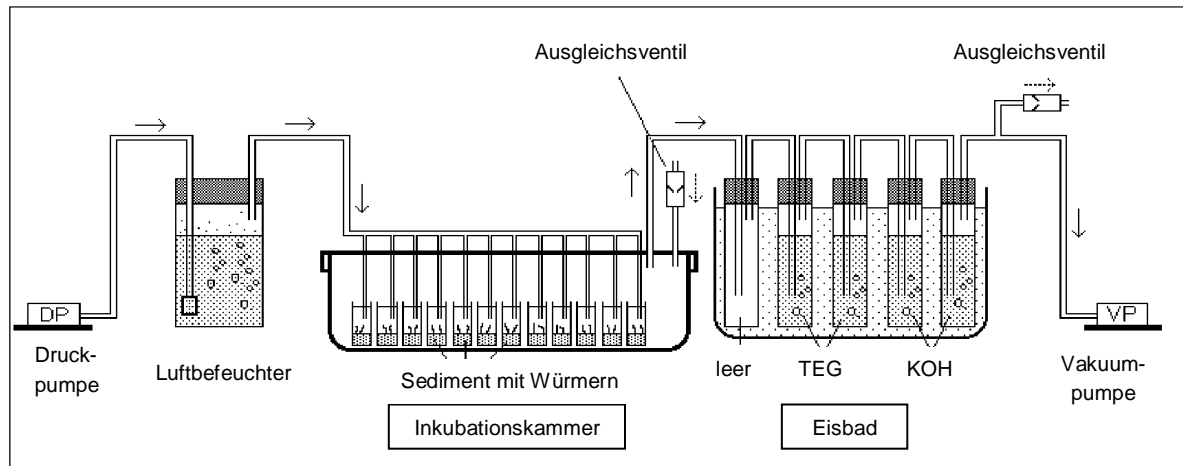


Abb. 2.5: Schema des Versuchsaufbaus der Sediment-Bioakkumulationsstudie (Grafik: P. Egeler).

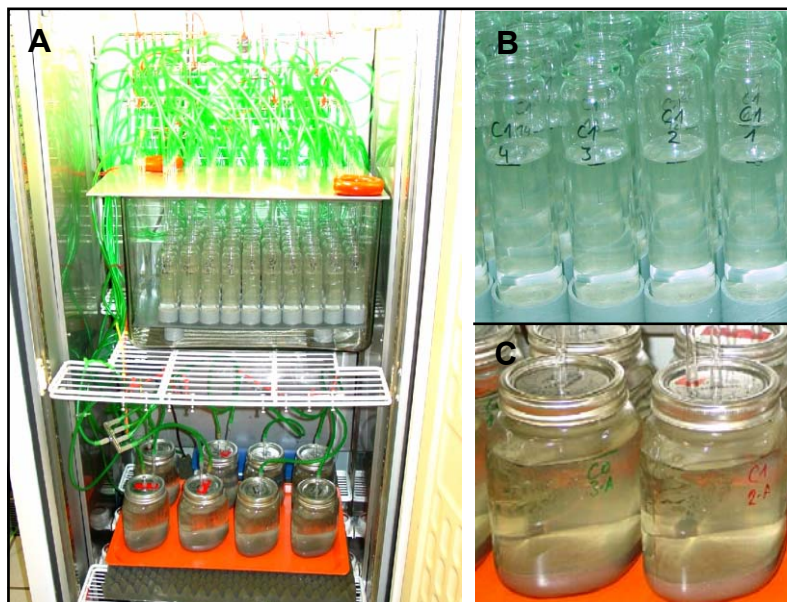


Abb. 2.6: A Versuchsanordnung der Bioakkumulationsstudie im Klimaschrank; Testgefäße: 100 mL-Rollrandgläser B und 1 L-Einmachgläser C.

Versuchsaufbau

Da mit einer radioaktiv markierten Substanz gearbeitet wurde, fand der Versuch in einem geschlossenen System statt (Abb. 2.5, Abb. 2.6-A). Dabei befanden sich die Testgefäße in einer Inkubationskammer (Vollglasaquarium), welches mit einer Metallplatte abgedeckt wurde. Die Metallplatte enthielt Bohrungen, durch welche das überstehende Wasser in jedem Testgefäß über eine separate Pasteurpipette belüftet wurde. Die Belüftung erfolgte mit über eine Waschflasche angefeuchteter Luft über eine Aquariumpumpe (WISA, Wilhelm Sauer GmbH & Co. KG, Wuppertal). Die Abluft wurde mit einer Saugpumpe (gleicher Hersteller) aus der Inkubationskammer über ein System gekühlter Waschflaschen geleitet. Dabei wurde die Luft zuerst über zwei mit je 200 mL Triethylenglykol gefüllte Flaschen geleitet, in denen eventuell flüchtige organische Stoffe aufgefangen werden sollten. In zwei weiteren Flaschen,

die mit je 200 mL einer 10%igen Kalilauge befüllt waren, sollte $^{14}\text{CO}_2$ aufgefangen werden, welches bei Abbauprozessen entstehen könnte. Die Waschflaschen befanden sich in einem Eisbad, um so den Dampfdruck herabzusetzen und das Verflüchtigen von Substanzen zu reduzieren. Zwischen jeweils zwei befüllten Waschflaschen befand sich je eine leere Waschflasche (nicht in Abb. 2.5 dargestellt), um das Übertreten von Lösungen zu vermeiden.

Versuchsdurchführung

Nach dem Einwiegen von je 26 g FG Sediment in die 100 mL-Gefäße mit Hilfe eines Elektro-Spatels wurden je 60 mL rekonstituiertes Wasser vorsichtig mit Hilfe einer Dosierhilfe über das Sediment gegeben, ohne dieses dabei aufzuwirbeln. Entsprechend des Probenahmeschemas (Tab. 2.11) wurden auf diese Weise 60 Gefäße befüllt (15 Beprobungen von jeweils 4 Replikaten), wovon 8 Gefäße mit undotiertem Sediment befüllt wurden (Kontrollen). In die acht 1 L-Gefäße wurde jeweils die 10-fache Menge an Sediment und rekonstituierten Wassers eingefüllt (4 Kontroll- und 4 kontaminierte Replikate). Nach dem Befüllen wurde der Wasserstand an den Außenwänden aller Gefäße markiert, um evtl. durch Verdunstung entstehenden Wasserverlust ersetzen zu können. Danach wurden die Gefäße in der Versuchsvorrichtung im Klimaschrank unter den beschriebenen Versuchsbedingungen inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Belüftung des überliegenden Wassers montiert und in Betrieb genommen.

Tab. 2.11: Probenahmeschema aus Kontrollen (C0) und kontaminierten Testgefäßen (C1): jedes X bedeutet die Entnahme und Beprobung von 4 Replikaten.

	Tag der Exposition/ Tag der Elimination	Testgefäße für Akkumulationskinetik (100 ml-Glasröhrchen)		Testgefäße für DC ¹ (1 L-Gläser)	
		C0	C1	C0	C1
Aufnahmephase	0 ²	X	X		
	1		X		
	3		X		
	7		X		
	14		X		
	21		X		
	28		X		
	35 ³	X	X	X	X
Eliminationsphase	E1		X		
	E2		X		
	E4		X		
	E7		X		
	E10		X		

¹: Dünnschichtchromatographie von Wurmextrakten

²: ca. 8 Stunden nach Expositionsbeginn

³: Zu Beginn war eine Expositionszeit von 28 Tagen geplant, während des Versuchs wurde diese auf 35 Tage verlängert

Nach weiteren 3 Tagen wurden die für den Versuch vorgesehenen und synchronisierten Würmer in die Testgefäße überführt und somit die Expositionsphase gestartet. Dabei wurden

nur intakte Würmer mit vollständig ausgebildeten Vorderenden randomisiert in Gruppen zu 10 Tieren auf mit rekonstituierten Wasser gefüllte Petrischalen verteilt. Diese wurden dann zeitgleich in die 100 mL-Testgefäße überführt. Beim Einsetzen der Würmer wurde die Belüftung des überstehenden Wassers kurzzeitig ausgeschaltet. Die 1 L-Testgefäße wurden mit jeweils 1 g FG Würmern besetzt. Diese Tiere stammten aus der Laborhaltung und wurden zuvor nicht synchronisiert. In regelmäßigen Abständen wurde in den Kontrollgefäßen im überliegenden Wasser die Temperatur, Sauerstoffgehalt und pH-Wert gemessen und dokumentiert.

Probenentnahme und Radioaktivitätsmessung

Während der Expositionsphase wurden an den in Tab. 2.11 angegebenen Tagen Sediment-, Wasser- und Wurmproben genommen und auf Gesamtradioaktivität hin analysiert. Kontrollproben wurden nur an den Tagen 0 und 35 genommen und analysiert. Zu jedem Probenentnahmezeitpunkt wurden je 4 Replikate beprobt. Dabei wurde jeweils die Exposition der Würmer beendet und die Testgefäße aufgelöst.

Um die Eliminationskinetik des während der Expositionsphase angereicherten 17α -Ethinylöstradiols aus den Würmern bestimmen zu können, wurden die Tiere der verbleibenden 20 Testgefäße nach der 35-tägigen Expositionsphase in unkontaminiertes Sediment überführt. Das hierfür benötigte Sediment wurde entsprechend der oben beschriebenen Prozedur hergestellt und 4 Tage vor dem Transfer der Würmer unter Versuchsbedingungen inkubiert. Während der 10-tägigen Eliminationsphase wurden an den Tagen 1, 2, 4, 7 und 10 jeweils 4 Testgefäße beprobt, wobei wiederum Proben aus allen Kompartimenten entnommen wurden.

Über den gesamten Testverlauf wurde die Gesamtradioaktivität in Proben des überstehenden Wassers, des Sediments und der Biotaproben mittels Flüssig-Szintillationszählung mit einem Flüssig-Szintillations-Zähler (LSC, *liquid scintillation counter*, TriCarb 2500 TR, Canberra-Packard, Dreieich) gemessen. Die Beprobung begann jeweils mit der Entnahme von 1 mL überstehenden Wassers mit einer Pipette aus den Testgefäßen. Diese wurden in ein Szintillations-Vial (Packard, Dreieich) überführt und mit 4 mL Szintillationscocktail (Ultima Gold, PerkinElmer Life Sciences GmbH, Rodgau-Jügesheim) sorgfältig für mehrere Sekunden auf einem Reagenzglasrüttler vermischt und direkt im LSC gemessen.

Zur Entnahme der Sedimentproben wurde zuerst das verbleibende überstehende Wasser abdekantiert. Daraufhin wurden aus jedem Testgefäß mit einem Edelstahlspatel vorsichtig und ohne dabei Würmer aus dem Sediment zu entnehmen, zwei Teilproben entnommen, die während des gesamten Experiments mittels zweier Meßmethoden analysiert wurden: 0,2-0,5 g FG Sedimentproben wurden in ein Szintillations-Vial überführt, mit 1 mL Aceton versetzt und anschließend 10 Sekunden auf einem Reagenzglasrüttler vermischt. Danach wurden 10 mL Szintillationscocktail zugegeben, erneut auf dem Rüttler geschüttelt und nach dem Absetzen im LSC gemessen. Zusätzlich wurden Teilproben von ca. 0,5 g FG entnommen und in Verbrennungshütchen (Canberra-Packard, Dreieich) überführt, die, nach Lagerung bei –

$18 \pm 2^\circ\text{C}$, in einem Probenverbrennungsautomat (Sample Oxidizer TriCarb 307, Canberra Packard, Dreieich) vollständig oxidiert und anschließend im LSC gemessen wurden. Die zweite Methode ergab Wiederfindungsraten von $101 \pm 9\%$ ($n = 3$), weshalb die Ergebnisse der Verbrennungsmethode für die weiteren Berechnungen herangezogen wurden.

Um nach den Probenahmen die Würmer aus dem verbliebenen Sediment zu isolieren, wurden ca. 10 mL rekonstituiertes Wasser hinzu gegeben und für einige Sekunden auf dem Reagenzglasrüttler aufgeschüttelt. Der gesamte Inhalt wurde dann in eine Petrischale gegeben, wo die Würmer mit einer Federstahlpinzette aussortiert wurden. Die Tiere wurden kurz in rekonstituiertem Wasser gespült, um anhaftende Sedimentreste zu entfernen. Durch leichtes Abtupfen am Rand der Petrischale wurde an den Würmern anhaftendes Wasser reduziert. Danach wurden die Würmer samt ihren Mageninhalten in ein vorgewogenes Szintillations-Vial gegeben, gewogen, und bei $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ bis zur späteren Analyse tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben mit jeweils 1 mL Gewebeauflöser (Soluene 350, Packard, Dreieich) behandelt und 5 h bei 50°C inkubiert. Danach wurden sie mit 100 μL HCl neutralisiert, mit 12,5 mL Szintillationscocktail (Hionic Fluor LSC Cocktail, Packard, Dreieich) vermischt und im LSC gemessen. Die Wiederfindungsrate dieser Methode lag bei $95 \pm 2\%$ ($n = 3$).

Extraktion und Analyse der Wurmproben

Um den Anteil an ungebundenen und unmetabolisierten EE2 der in den Würmern akkumulierten Gesamtradioaktivität zu messen, wurden Biotaprobe extrahiert und die gewonnenen Extrakte dünnenschichtchromatographisch analysiert. Dazu wurden die bereits beschriebenen 1 L-Glasgefäße mit jeweils 1 g FG Würmern unter denselben Versuchsbedingungen geführt, wie die 100 mL-Testgefäße für die Bestimmung der Akkumulations- und Eliminationskinetik. Aus diesen großen Testgefäßen (4 Kontroll- und 4 kontaminierte Replikate) wurden am Ende der Expositionsphase Wasser-, Sediment- und Biotaprobe entnommen und wie in den Kinetik-Experimenten untersucht. Aus dem restlichen Wurmgewebe wurden, wie nachfolgend beschrieben, Extrakte hergestellt und analysiert.

Die zu extrahierenden Wurmproben wurden zunächst gefriergetrocknet (Alpha 2-4, Christ, Osterode) und anschließend in 4 mL Methanol durch Behandlung mit einem Ultraschallstab (Labsonic 2000, B. Braun, Melsungen) 10 min bei 20 kHz homogenisiert. Danach wurden die Extrakte 10 min bei 1761 g zentrifugiert (Varifuge RF, Heraeus Sepatech, Hanau). Diese Prozedur wurde einmal mit 3 mL Methanol und zweimal mit je 3 mL Aceton wiederholt. Die Überstände wurden vereint und die Lösungsmittel im N_2 -Strom bis zur Trockne verdampft. Die Rückstände wurden mit Hilfe 10-minütiger Ultraschallung in 1 mL Methanol gelöst. Danach wurden die Extrakte durch einen 0,2 μm PTFE-Filter (Roth, Karlsruhe) gefiltert. Das Glasröhrchen wurde nochmals mit 0,5 mL Methanol gespült und die Spüllösung dem Extrakt zugegeben. In Aliquoten der Extrakte wurde die Radioaktivität im LSC bestimmt. Bis zur weiteren Analyse wurden die Extrakte bei ca. 4°C aufbewahrt. Die Wiederfindungsrate dieser Extraktionsprozedur betrug $65 \pm 2\%$ ($n = 4$).

Enzymatische Behandlung der Wurmextrakte

Vor der Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) wurden 300 µL-Teilproben der Extrakte mit dem Enzym „ β -D-glucuronide glucuronosohydrolase“ (β -Glucuronidase Typ HP-2, Sigma, München) behandelt. Dadurch sollten potenziell enthaltene Konjugate, wie Glucuronide oder Phosphat-Konjugate, vom ^{14}C -EE2 abgespalten und quantifizierbar gemacht werden. Hierfür wurden die Teilproben im N_2 -Strom bis zur Trockne verdampft und in 5 mL 0,2 M Natriumacetat-Puffer (pH 5) mit Hilfe von Rütteln und Ultrabeschallung aufgenommen. Nach der Zugabe von 100 µL des Enzyms β -Glucuronidase wurde die Suspension über Nacht bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wurde die Suspension dreimal mit je 5 mL Ethylacetat extrahiert und anschließend bei 1508 g zentrifugiert. Die organischen Phasen wurden vereint, bis zur Trockne eingengt und anschließend in 1 mL Methanol aufgenommen. Die Wiederfindungsrate dieser Inkubationsprozedur betrug $89 \pm 5\%$ ($n = 3$).

Dünnschichtchromatographie - Auftrennung der Wurmextrakte

Für die Auftrennung der enzymatisch behandelten und unbehandelten Wurmextrakte wurden mit Kieselgel beschichtete DC-Platten (60F₂₅₄, Merck, Darmstadt) verwendet. Als Laufmittel wurde CHCl_3 /Ethylacetat im Verhältnis 8:2 (v/v) verwendet (Molnár et al., 1982). In Vorversuchen konnten dem EE2 sehr ähnliche, nicht radioaktiv markierte Substanzen sehr gut aufgetrennt werden (Tab. 2.12).

Tab. 2.12: In Vorversuchen gemessene Retentionsfaktoren verschiedener Steroidhormone im DC-Lauf mit CHCl_3 /Ethylacetat 8:2 (v/v). N = Anzahl DC-Läufe.

Substanz	CAS-Nr.	Summenformel	Molekulargewicht	Retentionsfaktor	N
EE2	57-63-6	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$	296,41	$0,52 \pm 0,03$	4
Norethynodrel	68-23-5	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_2$	298,41	$0,60 \pm 0,01$	2
Norethisteron	68-22-4	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_2$	298,41	$0,42 \pm 0,01$	3
Mestranol	72-33-3	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_2$	310,42	$0,74 \pm 0,02$	4

Die optische Auswertung der DC-Platten mit unmarkierten Substanzen erfolgte unter kurzwelligem UV-Licht (UV-C) mit der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm. Auf jede DC-Platte wurde zusammen mit den zu analysierenden Extrakten als Referenz ^{14}C -EE2-Stammlösung aufgetragen. Die so entwickelten DC-Platten wurden mit einem digitalen Lesegerät (*digital autoradiograph scanner*, Type 3052, Berthold, Wildbad) gelesen und mit einem Signal-Analysegerät (*signal analyser*, Type 3061, Berthold, Wildbad) quantitativ ausgewertet.

Auswertung der Aufnahme- und Eliminationskinetik

Zu jedem Messzeitpunkt wurde die gemessene Gesamtradioaktivität in den Würmern (dpm/g FG) der gemessenen Gesamtradioaktivität im Sediment (dpm/g FG) des entsprechenden Replikats gegenübergestellt. Das Verhältnis dieser Faktoren bildet den Akkumulationsfaktor (AF). Somit wurde für jeden Messzeitpunkt der Mittelwert aus den 4 AFs der 4 Replikate bestimmt. Mit Hilfe des Computerprogramms SPSS 7.5.2G für Windows (SPSS Inc., 1997) wurden die so erhaltenen AFs durch nichtlineare Regressionsanalyse an Aufnah-

me- und Eliminationskurven angepasst. Durch Extrapolation kann eine Vorhersage des zeitlichen Verlaufs der Aufnahme und der Elimination, der Sediment-Aufnahmekonstante und der Eliminationskonstante während der Aufnahmeperiode getroffen werden. Gleichung 2.5 beschreibt den zeitlichen Verlauf der Aufnahme als Ein-Kompartiment-Modell:

$$\frac{dC_a(t)}{dt} = k_s \times C_s - k_e \times C_a$$

oder

$$C_a(t) = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e \times t}) \quad [\text{Gleichung 2.5}]$$

wobei C_a = Konzentration der Substanz in den Tieren [g Substanz pro g Tier]
 C_s = Konzentration der Substanz im Sediment [g Substanz pro g Sediment]
 k_s = Sediment-Aufnahmekonstante [d^{-1}]
 k_e = Eliminationskonstante während der Aufnahmeperiode [d^{-1}].

Wird ein *steady state*, d.h. ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme- und gleichzeitig dazu ablaufenden Eliminationsprozessen, erreicht, dann ist die Netto-Anreicherung der Testsubstanz gleich 0 und die Konzentration im Wurm (C_a) bleibt konstant. Auch wenn dieser Idealfall theoretisch erst bei $t = \infty$ eintritt, so kann der Bioakkumulationsfaktor (BAF) durch Umformen von Gleichung 2.5 bestimmt werden als:

$$C_{a,ss} = \frac{k_s}{k_e} \times C_{s,ss}$$

oder

$$\frac{C_{a,ss}}{C_{s,ss}} = \frac{k_s}{k_e} = BAF \quad [\text{Gleichung 2.6}]$$

wobei $C_{a,ss}$ = Konzentration der Substanz in den Würmern bei *steady state* [g Substanz pro g Wurm]
 $C_{s,ss}$ = Konzentration der Substanz im Sediment bei *steady state* [g Substanz pro g Sediment]

Um eine Vergleichbarkeit von Akkumulationsfaktoren für verschiedene Tierarten oder in verschiedenen Sedimenten gemessene Akkumulationsfaktoren gewährleisten zu können, werden die BAFs auf den Lipidgehalt der Testorganismen und den organischen Kohlenstoffgehalt des Sediments normiert (z.B. Tracey & Hansen, 1996). Der daraus resultierende Biota-Sediment-Akkumulationsfaktor (BSAF) ist der Quotient aus der auf den Lipidgehalt normierten Testsubstanzkonzentration im Wurm [mg/g TG] und der auf den organischen Kohlenstoffgehalt normierten Testsubstanzkonzentration im Sediment [mg/g TG] im *steady state*. Obwohl in der hier vorliegenden Bioakkumulationsstudie während der 35-tägigen Expositionszeit kein *steady state* erreicht wurde, wurden zwecks besserer Vergleichbarkeit die gemessenen AFs auf den Lipidgehalt der Würmer und den organischen Kohlenstoffgehalt des Sediments normiert ($AF_{\text{lipid/OC}}$).

Die gemessene Gesamtradioaktivität während der Eliminationsphase wurde zunächst in dpm/g FG beschrieben. Da während der Akkumulationsphase kein *steady state* erreicht wurde, konnten die während der Eliminationsphase gemessenen abnehmenden EE2-Konzentrationen bzw. Gesamtradioaktivität in den Würmern nicht in Bezug zu einem BAF gestellt werden. Deshalb wurde der maximale AF, gemessen am Ende der Expositionsphase, als Startwert (100%) der Eliminationskinetik herangezogen. Alle nachfolgenden, während der Eliminationsphase gemessenen Konzentrationen in den Würmern, wurden in % dieses Startwertes angegeben. Eine nichtlineare Regressionsanalyse der Elimination wurde unter Verwendung der Mittelwerte der jeweils vier Replikate zu jedem Messzeitpunkt durchgeführt.

Nach dem Transfer der Würmer aus dem kontaminierten Sediment in ein kontaminationsfreies Testsystem wird im einfachsten Fall die angereicherte Substanz unbeeinflusst von Aufnahmeprozessen eliminiert. Wird eine konstante exponentielle Konzentrationsabnahme festgestellt, so lässt sich der Eliminationsverlauf mit einem Ein-Kompartiment-Modell (Kukkonen & Landrum, 1994) beschreiben (Gleichung 2.7):

$$C_a^{(t=t)} = C_a^{(t=0)} \times e^{-k_e \times t} \quad [\text{Gleichung 2.7}]$$

wobei $C_a^{(t=0)}$ = Konzentration der Substanz in den Tieren zu Beginn der Eliminationsphase [g Substanz pro g Tier]
 k_e = Eliminationskonstante während der Eliminationsphase [d^{-1}].

Als Folge von ungleicher Verteilung der Testsubstanz in unterschiedlichen Körpergeweben der Testorganismen oder durch die Bildung und die eventuelle Bindung unterschiedlich schnell eliminierbarer Metabolite kann die akkumulierte Substanz aus verschiedenen Kompartimenten mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten ausgeschieden werden. Die Eliminationskinetik folgt dann einem Zwei-(oder Mehr-)Kompartiment-Modell, welches in Gleichung 2.8 beschrieben wird (Spacie & Hamelink, 1982):

$$C_a(t) = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{-k_b \times t} \quad [\text{Gleichung 2.8}]$$

wobei k_a = Eliminationskonstante für das Kompartiment A [d^{-1}]
 k_b = Eliminationskonstante für das Kompartiment B [d^{-1}].

Im Zwei-Kompartiment-Modell werden danach die Testorganismen in zwei Kompartimente (A + B) aufgeteilt, wobei A das Kompartiment mit schneller, und B das Kompartiment mit langsamer Ausscheidung der Testsubstanz darstellt. Die Auswertung der experimentellen Daten zur Akkumulations- und Eliminationskinetik basierte ausschließlich auf der gemessenen Gesamtradioaktivität. Alle Berechnungen wurden normiert auf Frischgewicht und Trockengewicht von Würmern und Sediment, sowie normiert auf den Lipidgehalt der Würmer und den organischen Kohlenstoffgehalt des Sediments durchgeführt.

2.2 Ergebnisse der ökotoxikologischen Studien

2.2.1 Resultate der durchgeführten Akuttests

Resultate des Algenwachstum-inhibitionstest

Temperatur und pH des Testmediums

Die gemessene Temperatur des Testmediums betrug während des Testverlaufs im Durchschnitt $22,1 \pm 0,4^\circ\text{C}$, mit einer Minimaltemperatur von $21,2^\circ\text{C}$ und einer Maximaltemperatur von $23,2^\circ\text{C}$. Der pH-Wert im Medium lag zu Testbeginn bei 7,7. Auf Grund der erhöhten Photosyntheseaktivität stieg bei den Kontrollen und der niedrigsten Testkonzentration der pH-Wert bis zu Testende um mehr als 1,5 Einheiten an.

Zelldichte

Die durchschnittliche Zelldichte in den Testkonzentrationen über den Expositionszeitraum ist in Tab. 2.13 angegeben. Die Zelldichte jedes Replikats wurde zweimal gezählt, so dass je Konzentrationsstufe und Beobachtungszeitpunkt 6 Werte zur Verfügung standen. Die Einzelwerte der Zählungen sind im Anhang in Tab. 8.10 aufgeführt. Nach 72 h Expositionszeit nahm die Zelldichte in den Kontrollen durchschnittlich um das 47-fache zu, nach 96 h Expositionszeit betrug die Zellzahl das 188-fache der anfänglichen Zahl.

Tab. 2.13: Mittelwerte der Algenzelldichte in den einzelnen Prüfkonzentrationen, Standardabweichungen in Klammern (n = 6).

Nominale Testkonzentration [mg/L]	Durchschnittliche Zellzahl x $10^4/\text{mL}$ nach:				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0	1,0	4,0 (1,9)	10 (3,6)	47 (17)	188 (23)
2,5	1,0	1,8 (0,8)	9,5 (5,0)	29 (15)	164 (27)
5	1,0	2,7 (1,6)	3,8 (2,8)	7,0 (2,2)	6,2 (4,0)
10	1,0	1,3 (1,0)	3,7 (1,2)	3,7 (1,2)	2,7 (1,6)
20	1,0	2,5 (2,0)	2,5 (1,2)	2,7 (1,0)	2,0 (1,5)
40	1,0	1,7 (0,8)	1,5 (0,5)	1,5 (0,5)	1,8 (1,3)
70	1,0	1,8 (1,0)	0,5 (0,8)	2,0 (0,9)	2,5 (2,8)
100	1,0	1,8 (1,2)	1,5 (0,8)	0,5 (1,2)	1,7 (1,4)

Die Vermehrung der Zellen in den verschiedenen Testkonzentrationen ist in Abb. 2.7 graphisch dargestellt. Die Graphik verdeutlicht die abrupte Abnahme der Zellvermehrung zwischen den Testkonzentrationen 2,5 und 5 mg/L. Bei 5 mg/L fand nahezu keine Zellvermehrung mehr statt. Die reguläre Testdauer beträgt 72 h. Nach Verlängerung der Expositionszeit auf 96 h wurde eine verstärkte Hemmwirkung der Prüfsubstanz beobachtet. Zur Auswertung und Berechnung der Effektkonzentrationen wurden die Werte nach 72 h und 96 h herangezogen.

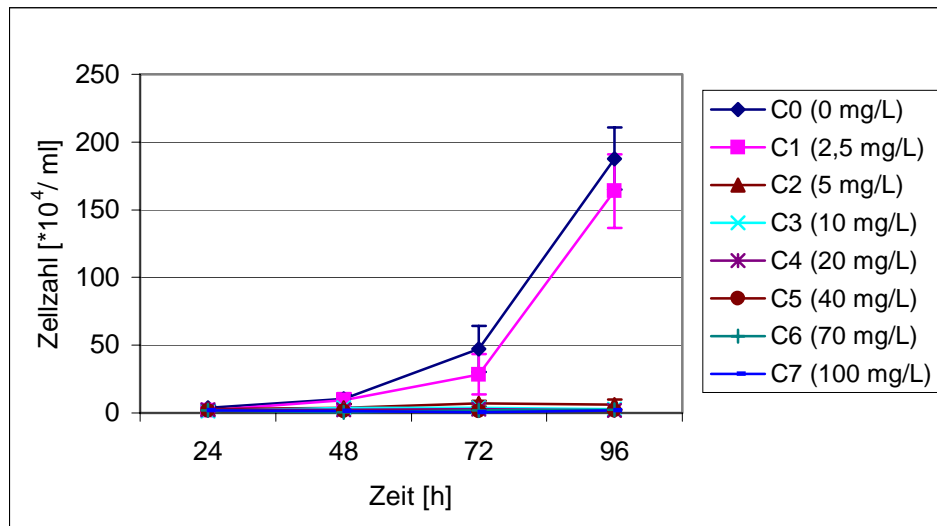


Abb. 2.7: Wachstumskurve von *Scenedesmus subspicatus* im Akuttest mit SMX; Mittelwerte der Zelldichte in den Prüfkonzentrationen und Kontrollen zu den Beobachtungszeitpunkten (Fehlerindikator entspricht Standardabweichungen; n = 6).

Konzentrations-Wirkungsverhältnis

1. Vergleich der Flächen unter den Wachstumskurven

In Abhängigkeit von den Testkonzentrationen wurden die Flächen A unterhalb der jeweiligen Wachstumskurven bestimmt und daraus die durchschnittliche prozentuale Hemmung des Zellwachstums I_A im Vergleich zur Kontrolle nach 72 h und 96 h abgeleitet (Tab. 2.14) und gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Die daraus resultierende Graphik verdeutlicht den steilen Anstieg der Dosis-Wirkungsbeziehung im Bereich zwischen 2,5 und 5 mg/L (Abb. 2.8).

Tab. 2.14: Flächen A unterhalb der Wachstumskurven und die durchschnittliche prozentuale Hemmung des Zellwachstums I_A nach 72 h und 96 h Expositionszeit (n = 6).

Nominale Testkonzentration [mg/L]	Expositionszeit: 72 h		Expositionszeit: 96 h	
	A	I_A [%]	A	I_A [%]
0	638	0	2735	0
2,5	416	35	2129	22
5	135	79	236	91
10	78	88	117	96
20	69	89	93	97
40	26	96	38	99
70	15	98	38	99
100	20	97	21	99

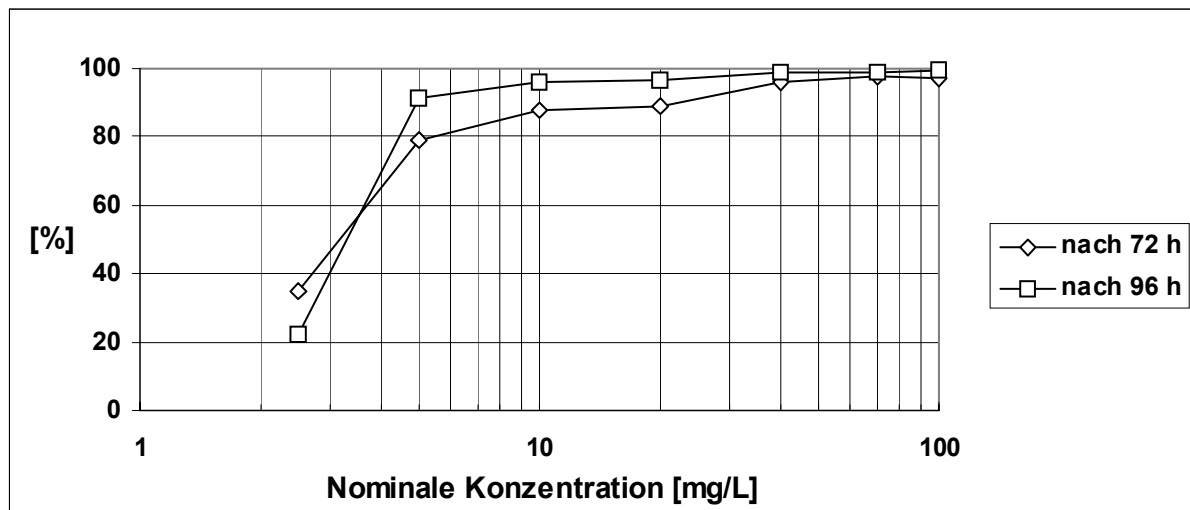


Abb. 2.8: Prozentuale Hemmung des Zellwachstums I_A in Abhängigkeit von den Testkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle.

Tab. 2.15: Spezifischen Wachstumsraten μ und die prozentuale Hemmung der spezifischen Wachstumsraten $I_{\mu x}$ für jede Testkonzentration für die Beobachtungszeitpunkte 72 h und 96 h.

Nominale Testkonzentration [mg/L]	72 h		96 h	
	μ	$I_{\mu x}$ [%]	μ	$I_{\mu x}$ [%]
0	0,0529	0	0,0545	0
2,5	0,0453	14	0,0530	3
5	0,0266	50	0,0187	66
10	0,0180	66	0,0096	82
20	0,0134	75	0,0062	89
40	0,0056	89	0,0043	92
70	0,0093	82	0,0059	89
100	-0,0941	278	0,0046	92

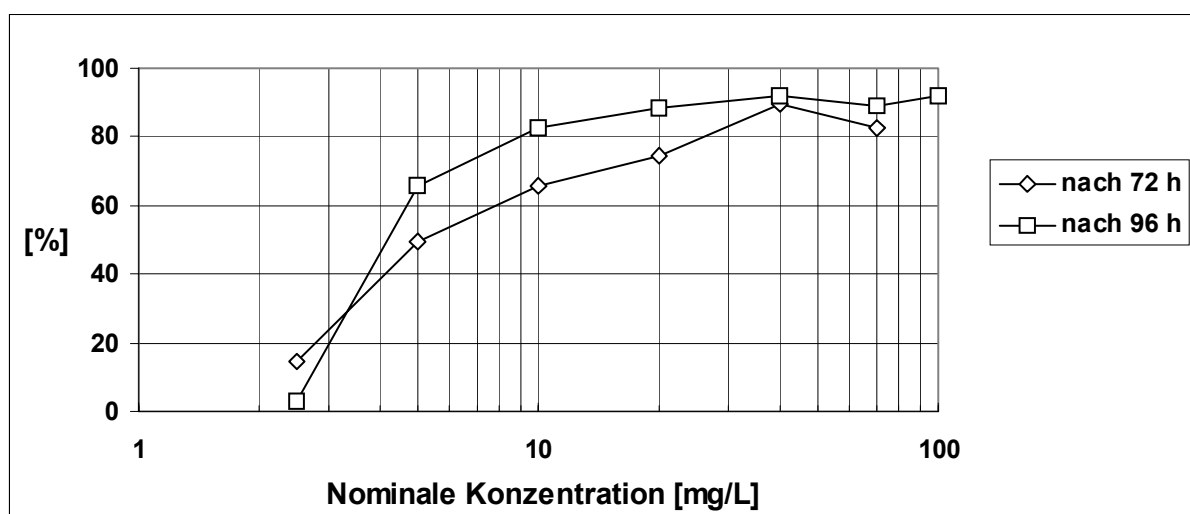


Abb. 2.9: Prozentuale Hemmung der spezifischen Wachstumsrate $I_{\mu x}$ in Abhängigkeit von den Testkonzentrationen im Vergleich zur spezifischen Wachstumsrate der Kontrolle μ_c .

2. Vergleich der Wachstumsraten

Tab. 2.15 zeigt die spezifischen Wachstumsraten μ und die prozentuale Hemmung der spezifischen Wachstumsrate $I_{\mu x}$ für jede Konzentration für die Beobachtungszeitpunkte 72 h und 96 h. Wie bei der Hemmung des Zellwachstums wurde die prozentuale Hemmung der spezifischen Wachstumsrate $I_{\mu x}$ gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen (Abb. 2.9).

Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden lediglich die Daten der Testkonzentrationen < 70 mg/L herangezogen, da ab dieser Konzentration bereits eine Hemmung des Zellwachstums um $> 95\%$ eintrat. Dadurch wurde in der statistischen Auswertung die Anzahl der Mehrfachvergleiche reduziert und somit die Empfindlichkeit der statistischen Tests und deren Trennschärfe erhöht. Die Varianzanalyse mit dem Cochran's-Test ergab eine Inhomogenität der Varianzen nach 96 h Expositionsdauer für die Parameter Zellvermehrung und Wachstumsrate. Aus diesem Grund wurde an Stelle des Williams-Tests der Bonferroni t-Test (Welch-Test für inhomogene Varianzen mit einer Angleichung nach Bonferroni) durchgeführt. Dieser wies lediglich für den Parameter Wachstumsrate (r) zum Zeitpunkt 96 h die niedrigste Testkonzentration als nicht signifikant verschieden zur Kontrolle aus, womit die $NOEC_r = 2,5$ mg/L bestimmt wurde. Zu den anderen Zeitpunkten und Parametern waren alle Werte signifikant verschieden zur Kontrolle, was in eine $NOEC < 2,5$ mg/L resultierte (Tab. 2.16). Die statistischen Berechnungen der Varianzanalyse und der Mehrfachvergleiche sind ausführlich im Anhang dargestellt (Tab. 8.17-Tab. 8.22).

Mittels Probit-Analyse wurden mittlere Effektkonzentration von $E_b C_{50/72\text{ h}} = 3,16$ mg/L für die Zellvermehrung (Auswertung des Zellzahlintegrals) und $E_r C_{50/72\text{ h}} = 6,6$ mg/L für die Wachstumsraten berechnet (Tab. 2.16). Der Index b steht für die Auswertung des Zellzahlintegrals, r steht für die Auswertung der spezifischen Wachstumsraten. Detaillierte Ergebnisse der Probit-Analyse sind im Anhang in Tab. 8.11-Tab. 8.13 und Tab. 8.14-Tab. 8.16 jeweils für die Parameter Zellvermehrung und Wachstumsrate aufgeführt.

Da die mittlere Effektkonzentration EC_{50} nur geringfügig oberhalb der niedrigsten eingesetzten Testkonzentration lag und ab der nächst höheren Testkonzentration die Wachstumshemmung bis zu 90% betrug (Zellvermehrung, 96 h), sind die Vertrauensintervalle für $p \leq 0,05$ verhältnismäßig groß und die Effektkonzentrationen dadurch mit erhöhter Unsicherheit behaftet (vgl. Tab. 8.13 und Tab. 8.16 im Anhang).

Tab. 2.16: Effektkonzentrationen im Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX nach 72 h und 96 h Expositionsdauer [mg/L].

Effektkonzentration	Zellvermehrung (b)		Wachstumsrate (r)	
	72 h	96 h	72 h	96 h
EC_{50}	3,16	3,21	6,6	4,96
LOEC	$< 2,5$	$< 2,5$	$< 2,5$	5
NOEC	$< 2,5$	$< 2,5$	$< 2,5$	2,5

Chemische Begleitanalytik

In den Proben der Kontrollen konnte die Testsubstanz SMX bei einer Bestimmungsgrenze von 200 ng/L zu Testbeginn und Testende nicht nachgewiesen werden. Die Analyse der Testlösungen ergab Wiederfindungsraten von 104-125% (Tab. 2.17), wobei über den Versuchszeitraum keine Abnahme der SMX-Konzentrationen in den Testmedien zu erkennen war. Eine Korrektur der oben berechneten Effektkonzentrationen wurde nicht durchgeführt. Die Analysen der Testlösungen in den parallel geführten Testgefäßen ohne Algenzellen ergaben Konzentrationen im gleichen Bereich wie die Testlösungen mit Algenzellen, was darauf schließen lässt, dass die Grünalgen während der Versuchsdauer von 96 h keine Herabsetzung der Testsubstanzkonzentration im Testmedium bewirkt haben.

Tab. 2.17: Wiederfindungsraten von SMX im Algenwachstum-inhibitionstest in Kontrollen, verschiedenen Testkonzentrationen und parallel geführten Testlösungen ohne Algenzellen bei Testbeginn und bei Testende.

Probenahme-zeitpunkt [h]	Nominale Konzentration [mg/L]	Gemessene Konzentration [mg/L]	Wiederfindungs- rate [%]
0	0	< BG	-
0	2,5	2,7	109
0	40	42	104
0	100	107	107
96	0	< BG	-
96	2,5	2,7	108
96	40	42	105
96	100	125	125
96 (o.A.)	0	< BG	-
96 (o.A.)	2,5	2,6	102
96 (o.A.)	40	45	113
96 (o.A.)	100	103	103

BG = Bestimmungsgrenze: 200 ng/L

o.A. = Testlösungen ohne Algenzellen

Resultate des akuten Daphnien-Toxizitätstests

O₂-Gehalt, Temperatur und pH

Der Sauerstoffgehalt der Testmedien lag zu Testbeginn bei einem Minimalwert von 8,4 mg/L oder 94% Sättigung und erreichte bei Testende in allen Testkonzentrationen 100% Sättigung. Die Durchschnittstemperatur betrug $19,3 \pm 0,1^\circ\text{C}$ mit einer Minimaltemperatur von $19,1^\circ\text{C}$ und einer Maximaltemperatur von $19,5^\circ\text{C}$. Der pH-Wert in den Testmedien betrug bei Testbeginn 8,0 in den Kontrollen und 6,4 in der höchsten Testkonzentration (160 mg/L) mit einem konstant absteigenden Gradienten in den dazwischen liegenden Konzentrationen. Der Test wurde ohne Einstellung des pH-Wertes durchgeführt. Über den Testzeitraum von 48 h näherte sich der pH-Wert in den verschiedenen Testkonzentrationen einander an und betrug bei Testende 7,8 in den Kontrollen und 7,3 in der höchsten Testkonzentration. Eine nachteilige Auswirkung auf die Daphnien ist bei pH 6,4 nicht zu erwarten (OECD, 2000b).

Auswertung der biologischen Parameter

Die Anzahl immobiler Daphnien wurde nach 24 h und 48 h bestimmt und das Ergebnis in Tab. 2.18 zusammengefasst. Diese Tabelle verdeutlicht den steilen Anstieg der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen den Testkonzentrationen 80 und 160 mg/L. Eine ausführliche Auflistung der Einzeldaten befindet sich in Tab. 8.23 im Anhang.

Tab. 2.18: Anzahl immobiler Daphnien in den Testkonzentrationen und Kontrollen nach 24 h und 48 h Expositionsdauer.

Nominale Testkonzentration [mg/L]	Anzahl Daphnien je Konzentration bei Testbeginn	Anzahl immobiler Daphnien nach:	
		24 h	48 h
0	20	0	0
5	20	0	0
10	20	0	1
20	20	0	0
40	20	0	0
80	20	0	0
160	20	15	17

Aus der Anzahl immobiler Daphnien je Testkonzentration wurden mittels Probit-Analyse die Effektkonzentrationen (EC_x) errechnet (Tab. 2.19). Für diese Berechnung wurden nur die Konzentrationen zwischen 20 und 160 mg/L herangezogen, da sonst die hohe Anzahl an Testkonzentrationen mit 0% Effekt zu einer Verzerrung der Dosis-Wirkungsbeziehung und somit zu einer unrealistischen Abflachung der Dosis-Wirkungskurve geführt hätte. Dementsprechend wurde eine EC_{50} von 125 mg/L bestimmt. Die $NOEC_{48\text{ h}}$ wurde nicht statistisch berechnet, sondern auf Grund der Datenlage bei 80 mg/L festgestellt.

Als Vergleich zu dem über Probit-Analyse ermittelten EC_x -Werten wurde das geometrische Mittel bestimmt, welches alternativ als EC_{50} verwendet wird, wenn zwischen 2 benachbarten Konzentrationen, die maximal mit dem Faktor 2,2 auseinander liegen, 0 und 100% Effekt auftreten:

$$EC_{50} = \sqrt{NOEC \times LOEC}.$$

Hierfür wurde als $NOEC = 80\text{ mg/L}$ und als $LOEC = 160\text{ mg/L}$ eingesetzt, was in eine EC_{50} von 113 mg/L resultierte und die mittels Probit-Analyse errechnete $EC_{50} = 125\text{ mg/L}$ bestätigt.

Tab. 2.19: Effektkonzentrationen von SMX im Daphnien-Toxizitätstest nach 48 h Expositionsdauer.

Effektkonzentration	[mg/L]
$EC_{10(48\text{ h})}$	89
$EC_{50(48\text{ h})}$	125
$EC_{90(48\text{ h})}$	175

Chemische Begleitanalytik

In den Proben der Kontrolllösungen konnte die Testsubstanz SMX bei einer Bestimmungsgrenze von 200 ng/L nicht nachgewiesen werden. Die Analyse der Testmedien ergab Wiederfindungsraten von 96-104% (Tab. 2.20), wodurch das Qualitätskriterium der Konstanz der Testkonzentrationen innerhalb 80% der Anfangskonzentrationen erfüllt wurde. Die real gemessenen Konzentrationen entsprachen somit nahezu den eingesetzten nominalen Testkonzentrationen, die berechneten Effektkonzentrationen wurden deshalb nicht korrigiert.

Tab. 2.20: Wiederfindungsraten von SMX im Daphnien-Toxizitätstest in Kontrollen und Testkonzentrationen bei Testbeginn und Testende.

Probenahme- zeitpunkt [h]	Nominale Konzentration [mg/L]	Gemessene Konzentration [mg/L]	Wiederfindungs- rate [%]
0	0	< BG	-
0	5	5,2	104
0	40	38	96
0	160	162	101
48	0	< BG	-
48	5	4,96	99
48	40	40	100
48	160	155	97

BG = Bestimmungsgrenze: 200 ng/L

Resultate der akuten Fisch-Toxizitätstests

O₂-Gehalt, Temperatur und pH

Der Sauerstoffgehalt, die Temperatur und der pH der Testmedien wurden zu Testbeginn vor der Exposition der Fische und während des gesamten Versuchszeitraumes im 24 h-Rhythmus in allen Testgefäßen beider Fisch-Akutttests (SMX und CBZ) gemessen. Tab. 2.21 gibt eine Übersicht über die Durchschnittswerte dieser Parameter während des Testverlaufs, eine Auflistung der Einzelmessungen befindet sich im Anhang (Tab. 8.24 und Tab. 8.25).

In beiden Fisch-Akutttests lag der Sauerstoffgehalt des Testmediums während des gesamten Versuchszeitraumes in allen Konzentrationen im Sättigungsbereich. Der pH-Wert blieb zwischen 7,0 und 7,9 stabil. Die Temperatur des Testmediums war im Test mit SMX sehr konstant, im Test mit CBZ lag sie bei Testbeginn zwischen 25,8 und 26,1°C, fiel allerdings bis Testende auf 24,3-24,5°C ab. Diese geringfügige Temperaturveränderung hatte keine Auswirkungen auf die Empfindlichkeiten der Fische gegenüber der Testsubstanz.

Tab. 2.21: Durchschnittliche Sauerstoffgehalte, pH-Werte und Temperaturen der Testmedien während des Testzeitraums in den akuten Fisch-Toxizitätstests mit SMX und CBZ. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min. = minimal gemessener Wert, Max. = maximal gemessener Wert, N = Anzahl Messungen.

Testsubstanz	Parameter	MW	SD	Min.	Max.	N
SMX	O ₂ [%]	100	0,0	100	100	10
	O ₂ [mg/L]	8,9	0,1	8,7	9,2	10
	pH	7,6	0,2	7,3	7,9	10
	Temp. [°C]	25,7	0,0	25,6	25,7	10
CBZ	O ₂ [%]	108	4,4	100	118	23
	O ₂ [mg/L]	8,9	0,4	8,1	9,8	23
	pH	7,5	0,2	7,0	7,8	23
	Temp. [°C]	25,6	0,6	24,3	26,1	23

Auswertung der biologischen Parameter

1. Akute Fisch-Toxizität von SMX

Der Fisch-Toxizitätstest mit dem Antibiotikum SMX wurde in Form eines Limit-Tests mit einer Testkonzentration von 100 mg/L durchgeführt. Wie auf Grund des spezifischen Wirkmechanismus von SMX angenommen werden konnte, traten bis zum Testende nach 96 h Expositionsdauer in keinem der Testgefäße, weder in der Kontrolle, noch in der Prüfkonzentration von 100 mg/L Mortalitäten auf. Verhaltensänderungen oder äußere physische Störungen an den Prüforganismen wurden nicht beobachtet. Es wurde keine statistische Auswertung durchgeführt, und die LC₅₀ für *Danio rerio* wurde auf > 100 mg SMX/L festgelegt.

2. Akute Fisch-Toxizität von CBZ

Mortalität

Die Mortalität in der Kontrolle war bis Testende < 10%. In der höchsten Testkonzentration bei 100 mg/L waren bereits nach 3 h alle eingesetzten Fische tot. 15 h nach Testbeginn waren in der nächst darunter liegenden Testkonzentration (50 mg/L) bereits 9 von 10 Tieren stark in ihrem Schwimmverhalten beeinträchtigt. Sie trieben auf dem Rücken liegend am Boden des Beckens und bewegten sich nach leichter Reizung nur noch äußerst langsam. 24 h nach Testbeginn waren 3 Tiere dieser Konzentration gestorben, am folgenden Tag starben die 7 verbliebenen Fische dieser Testkonzentration. Im weiteren Verlauf des Tests traten keine Mortalitäten mehr auf und es waren keine Verhaltensänderungen der Tiere oder sonstige Unterschiede in den Testgefäßen im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Tab. 2.22 gibt eine Übersicht über die Anzahl und Zeitpunkte von Mortalitäten im Testverlauf.

Tab. 2.22: Anzahl Mortalitäten in den Testkonzentrationen während des Testverlaufs im Fisch-Akuttest mit CBZ.

Nominale Konzentration [mg/L]	Anzahl Fische bei Testbeginn	Mortalitäten nach Expositionszeit [h]:					Mortalitäten je Konzentration bei Testende
		3	24	48	72	96	
0	10	0	0	0	0	0	0
6,25	10	0	0	0	0	0	0
12,5	10	0	0	0	0	0	0
25	10	0	0	0	0	0	0
50	10	0	3	7	-	-	10
100	10	10	-	-	-	-	10

Berechnung der mittleren Effektkonzentration

Da zwischen den aufeinander folgenden Konzentrationen von 25 und 50 mg/L jeweils 0 und 100% Mortalität auftrat, wurde gemäß OECD (1992a) das geometrische Mittel zur Bestimmung der mittleren letalen Wirkkonzentration LC_{50} herangezogen:

$$LC_{50} = \sqrt{NOEC \times LOEC},$$

wobei hier die $NOEC = 25$ mg/L und die $LOEC = 50$ mg/L betrug. Die LC_{50} für *Danio rerio* nach 96 h ist demnach 35,4 mg/L:

$$LC_{50/96\text{ h}} = \sqrt{25 \times 50} = 35,4 \text{ mg CBZ/L.}$$

Chemische Begleitanalytik

In beiden Fisch-Toxizitätstests mit SMX und CBZ konnten in den Proben der Kontrolllösungen zu Beginn und bei Ende des Tests die Testsubstanzen bei einer Bestimmungsgrenze von 200 ng/L nicht nachgewiesen werden (Tab. 2.23). Im Test mit SMX ergab die Analyse der Proben aus der Testkonzentration mit 100 mg/L Wiederfindungsraten von 113% bei Testbeginn und 97% bei Testende. Die getestete Konzentration entsprach somit nahezu der nominalen Testkonzentration von 100 mg/L.

Tab. 2.23: Wiederfindungsraten von SMX und CBZ in den Testlösungen während der Fisch-Akuttests.

Test-substanz	Probenahme-zeitpunkt [h]	Nominale Konzentration [mg/L]	Gemessene Konzentration [mg/L]	Wiederfindungs-rate [%]
SMX	0	0	< BG	-
	0	100	113	113
	96	0	< BG	-
	96	100	97	97
CBZ	0	0	< BG	-
	0	6,25	6,2	100
	0	25	27	107
	0	100	86	86
	96	0	< BG	-
	96	6,25	6,6	105
	96	25	27	107

BG = Bestimmungsgrenze: 200 ng/L

Im Test mit CBZ wurde die höchste Testkonzentration nur bei Testbeginn beprobt (100 mg/L), da die beiden höchsten Konzentrationsstufen bereits während des Testverlaufs aufgelöst wurden. Bei Testende war somit die zuvor mittlere Konzentrationsstufe von 25 mg/L zur verbliebenen höchsten Konzentrationsstufe geworden. Die Analyse der Proben aus den Testlösungen zeigte eine durchgehend hohe Wiederfindungsrate der Testsubstanz CBZ (Tab. 2.23), die Berechnungen der Effektkonzentrationen wurden deshalb nicht korrigiert.

Resultate der Fischembryo-Toxizitätstests

O₂-Gehalt, Temperatur und pH

Um Verletzungen der empfindlichen Fischeier zu vermeiden, wurden die physikalischen und chemischen Parameter bei Testbeginn vor der Exposition (0 h) und 48 h nach der Exposition der Fischeier in den Testmedien gemessen. Tab. 2.24 enthält eine Übersicht über die Durchschnittswerte der Parameter, eine Auflistung der Einzelwerte befindet sich im Anhang in Tab. 8.26 und Tab. 8.27. In den Fischembryo-Tests mit SMX und CBZ lag der Sauerstoffgehalt des Testmediums über den Versuchszeitraum in allen Testkonzentrationen im Sättigungsbereich. Der pH-Wert lag in engen Grenzen zwischen 7,2 und 7,8. Die Temperatur des Testmediums schwankte in beiden Tests maximal um 0,8°C.

Tab. 2.24: Durchschnittliche Sauerstoffgehalte, pH-Werte und Temperaturen in den Testmedien während des Testzeitraums in den Fischembryo-Toxizitätstests mit SMX und CBZ. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min. = minimal gemessener Wert, Max. = maximal gemessener Wert, N = Anzahl Messungen.

Testsubstanz	Parameter	MW	SD	Min.	Max.	N
SMX	O ₂ [%]	101	9,1	92	110	4
	O ₂ [mg/L]	8,5	1,0	7,6	9,5	4
	pH	7,4	0,2	7,2	7,5	4
	Temp. [°C]	25,5	0,1	25,4	25,7	4
CBZ	O ₂ [%]	98	6,7	89	110	12
	O ₂ [mg/L]	8,0	0,5	7,3	8,8	12
	pH	7,6	0,1	7,5	7,8	12
	Temp. [°C]	26,6	0,3	26,2	27,0	12

Auswertungen der biologischen Parameter

1. Fischembryo-Toxizität von SMX

Beobachtungen nach 1,5 h Expositionszeit

Nach ca. 1,5 h Expositionsdauer wurden bei der ersten Beobachtung Fotos der einzelnen Replikate angefertigt. Es waren keine koagulierten Eier oder sonstige Auffälligkeiten zu beobachten. Abb. 2.10-A und Abb. 2.10-D zeigen Ausschnitte von Replikaten, in denen deutlich die Blastula der Eier im Stadium ca. 1,75 h bis 2,25 h nach der Befruchtung zu erkennen ist.

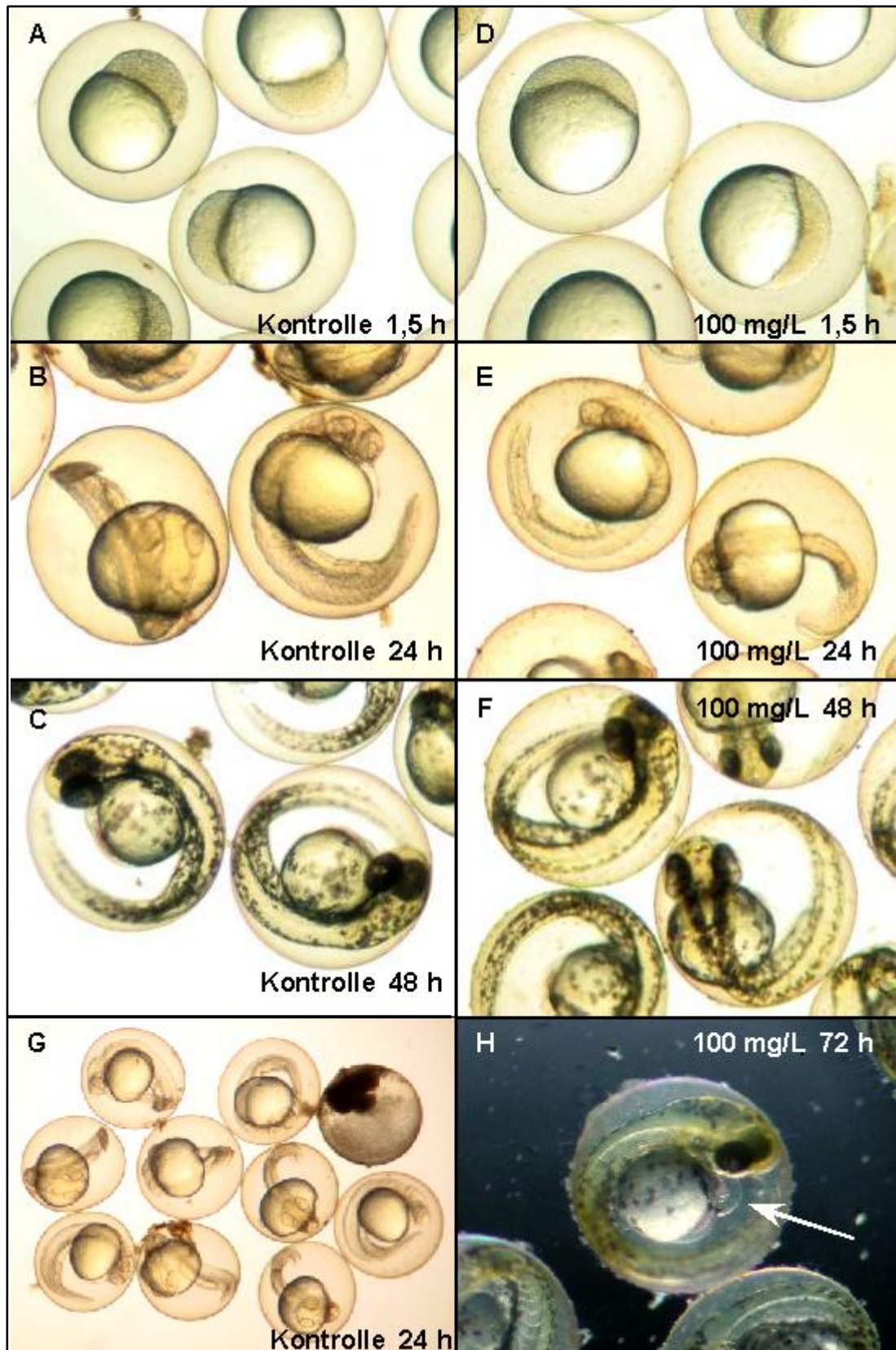


Abb. 2.10: Entwicklungsstadien von Fischembryonen (*Danio rerio*) im Toxizitätstest mit SMX (Ausschnitte aus verschiedenen Replikaten): Embryonen aus der Kontrolle (A-C) und 100 mg/L (D-F) jeweils nach 1,5 h, 24 h und 48 h Expositionsdauer; G koagulierte Ei (o. rechts) in einer Kontrolle nach 24 h Exposition; H Embryo mit perikardialem Ödem (Pfeil) nach 72 h Exposition bei 100 mg/L.

Beobachtungen nach 24 h Expositionszeit

In den Kontrollen befand sich ein koaguliertes Ei, welches aus dem Testgefäß entfernt wurde (Abb. 2.10-G). An allen anderen Fischembryonen waren die Anlagen der Somiten deutlich zu erkennen, die Schwänze waren bereits vom Dotter gelöst (Abb. 2.10-B und Abb. 2.10-E). In allen Replikaten konnten spontane Muskelbewegungen der Embryonen beobachtet werden.

Beobachtungen nach 48 h Expositionszeit

Nach 48 h Expositionsdauer koagulierten keine weiteren Fischeier. Bei allen Fischembryonen war der Herzschlag vorhanden sowie die Pigmentation teilweise ausgebildet (Abb. 2.10-C und Abb. 2.10-F). In einem Replikat der Testkonzentration 100 mg/L befand sich ein Embryo mit etwas vergrößertem Perikard. Tab. 2.25 enthält eine Übersicht über die beobachteten Endpunkte und die Häufigkeit ihres Auftretens nach 48 h Expositionszeit. Eine statistische Auswertung wurde nicht durchgeführt, da keine letalen Effekte nach 48 h festzustellen waren. Demnach war die $LC_{50/48\text{ h}} > 100\text{ mg SMX/L}$.

Tab. 2.25: Anzahl an koagulierten Eiern und an Fischembryos mit letalen Effekten nach 48 h Exposition gegenüber SMX.

Beobachtete Parameter nach 48 h Exposition	Nominale Testkonzentration [mg/L]	
	0	100
koagulierte Eier	1	0
Embryonen ohne Anlage der Somiten	0	0
Schwanz nicht vom Dotter abgelöst	0	0
kein Herzschlag vorhanden	0	0
Gesamtzahl Embryonen mit letalen Effekten nach 48 h Expositionsdauer	1	0

Bestimmung der Herzfrequenz nach 48 h Expositionszeit

Die Herzfrequenz wurde bei insgesamt 16 Individuen in der Kontrolle und in der Konzentrationsstufe 100 mg/L bestimmt. Die Herzfrequenz lag etwas höher als in der verwendeten Richtlinie als normal für dieses Entwicklungsstadium angegeben wird ($140\text{-}160\text{ min}^{-1}$). Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Fischembryonen in der Testkonzentration konnten nicht festgestellt werden (Tab. 2.26). Die $EC_{50/48\text{ h}}$ für den Endpunkt Herzschlagfrequenz war $> 100\text{ mg SMX/L}$. Eine Übersicht über die Einzelmessungen enthält Tab. 8.28 im Anhang.

Beobachtungen nach 72 h Expositionszeit:

Nach 72 h Expositionszeit wurde im gleichen Replikat der Testkonzentration 100 mg/L, indem sich zuvor ein Embryo mit etwas vergrößertem Perikard befand, ein Embryo mit perikardialem Ödem erkannt (Abb. 2.10-H). Andere Auffälligkeiten oder Störungen in der Entwicklung der Embryonen waren nicht zu beobachten. Der Test wurde nach 72 h Expositionsdauer beendet.

Tab. 2.26: Durchschnittliche Herzschlagfrequenz [min^{-1}] der Fischembryonen nach 48 h Expositionsdauer gegenüber SMX; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung; N = Anzahl Messungen.

Nominale Testkonzentration [mg/L]	Expositionszeit [h]	MW	SD	N
0	48	168	8	16
100	48	173	10	16

2. Fischembryo-Toxizität von CBZ

Beobachtungen nach 24 h Expositionszeit

In den Kontrollen befanden sich drei koagulierte Eier, welche aus den Testgefäßen entfernt wurden. In der niedrigsten Testkonzentration befanden sich ebenfalls drei koagulierte Eier und ein Embryo außerhalb des Chorions (Eihülle). In der Konzentrationsstufe 12,5 mg/L befanden sich 5 koagulierte Eier. In der mittleren Konzentrationsstufe befand sich ein koaguliertes Ei und ein anderes, dessen Embryo eine geringere Anzahl an Somiten aufwies und dessen Dotter deformiert war (Abb. 2.11-A). In der darüber liegenden Konzentrationsstufe bei 50 mg/L befanden sich drei koagulierte Eier und ein Ei mit verringertem Turgor, was an dem an mehreren Stellen leicht eingedrückten Chorion zu erkennen war. Die Entwicklung dieses Eies schien allerdings ungestört. In der höchsten Konzentrationsstufe befand sich ein koagulierte Ei.

Beobachtungen nach 48 h Expositionszeit

In den Kontrollen waren nach 48 h Expositionszeit alle verbliebenen Embryonen normal entwickelt und der Herzschlag war vorhanden. Das Chorion eines Eies war leicht eingedrückt, der Embryo aber normal entwickelt (Abb. 2.11-C). In der niedrigsten Testkonzentration war der Embryo außerhalb seines Chorions koaguliert (Abb. 2.11-D). Alle verbliebenen Embryonen waren normal entwickelt und der Herzschlag war vorhanden, ebenso in der Konzentrationsstufe 12,5 mg/L. Bei dem Embryo in der mittleren Konzentrationsstufe (25 mg/L), bei dem zuvor ein deformierter Dotter beobachtet wurde, löste sich der Schwanz nicht regulär vom Dottersack ab (Abb. 2.11-B), Herzschlag und Blutfluss waren allerdings vorhanden. Alle übrigen Embryonen waren normal entwickelt und der Herzschlag war vorhanden. In der Konzentrationsstufe 50 mg/L konnte das Ei, bei dem zuvor ein verringerter Turgor beobachtet wurde, diesen wieder aufbauen. Auch in dieser Testkonzentration sowie in der höchsten Konzentration waren die verbliebenen Embryonen normal entwickelt, und der Herzschlag war vorhanden. Tab. 2.27 enthält eine Übersicht über die Häufigkeit der beobachteten Endpunkte nach 48 h Exposition.

Außer in den beiden niedrigsten Konzentrationsstufen wurde im Vergleich zur Kontrolle nach 48 h Exposition kein erhöhtes Auftreten von letalen Effekten beobachtet. Zur Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen dem Auftreten von Mortalitäten in der Kontrolle und den Testkonzentrationen wurde auf Grund der geringen Anzahl an Replikaten der *Fischer's Exact*

Binomial Test mit dem Statistik Programm ToxRat Professional Version 2.07 durchgeführt. Damit konnten bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und allen Testkonzentrationen festgestellt werden. Die $LC_{50/48\text{ h}}$ ist demnach $> 100\text{ mg CBZ/L}$.

Tab. 2.27: Übersicht über die Anzahl an koagulierten Eiern und Fischembryos mit letalen Effekten in den Testkonzentrationen nach 48 h Expositionsdauer gegenüber CBZ.

Beobachtete Parameter nach 48 h Exposition	Nominale Testkonzentration [mg/L]					
	0	6,25	12,5	25	50	100
koagulierte Eier	3	3	5	1	3	1
Embryonen ohne Anlage der Somiten	0	0	0	1 ²	0	0
Schwanz nicht vom Dotter abgelöst	0	0	0	0	0	0
Sonstige Beobachtungen	0	1 ¹	0	0	(1) ³	0
Gesamtzahl Embryonen mit letalen Effekten	3	4	5	2	3	1
Letale Effekte in % der zu Beginn eingesetzten Anzahl an Fischeiern	7,5	10	12,5	5	7,5	2,5

¹: Embryo außerhalb des Chorions mit einsetzender Koagulation (siehe Abb. 2.11-D)

²: Embryo mit sehr wenigen Somiten und deformierten Dotter (Abb. 2.11-A und B nach 24 h und 48 h)

³: Ei mit verringertem Turgor nach 24 h Expositionsdauer, der Turgor konnte nach 29 h Expositionsdauer allerdings wieder regeneriert werden

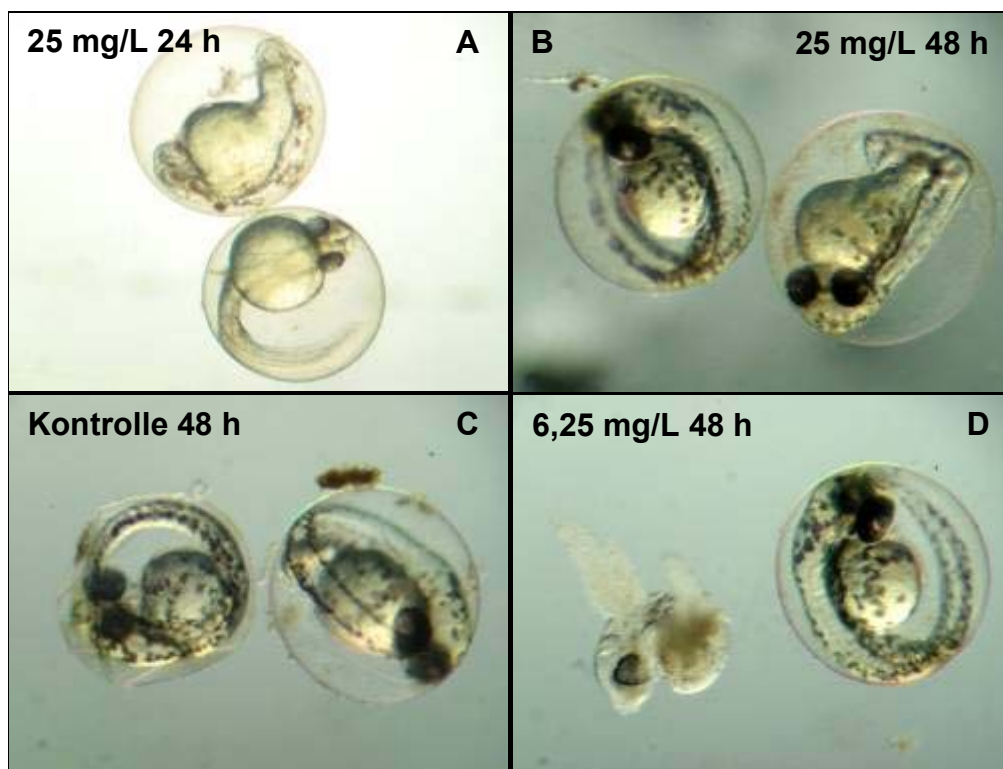


Abb. 2.11: Fischembryonen (*Danio rerio*) im Toxizitätstest mit CBZ (Ausschnitte): A und B Embryo mit deformiertem Dottersack neben normal entwickelten Embryo bei 25 mg/L nach 24 h und 48 h Exposition gegenüber CBZ; C eingedrücktes Chorion eines Embryos der Kontrollen nach 48 h Expositionsdauer; D koagulierender Embryo außerhalb des Chorions bei 6,25 mg/L nach 48 h Expositionszeit.

Beobachtungen nach 96 h Expositionszeit

Nach 96 h Expositionsdauer wurden die Fischembryonen erneut observiert. Dabei wurde die Herzschlagfrequenz an 8 zufällig ausgewählten Embryonen der Kontrollen und 4 Embryonen pro Konzentrationsstufe gemessen, sowie die Anzahl an bis zu diesem Zeitpunkt geschlüpften Larven bestimmt und im Vergleich zur Kontrolle ausgewertet. Die Schlupfrate wird dabei als Schlupfrate nach 96 h Exposition definiert, sie kann nicht als absolute Schlupfrate gewertet werden, da der Test nach 96 h beendet wurde.

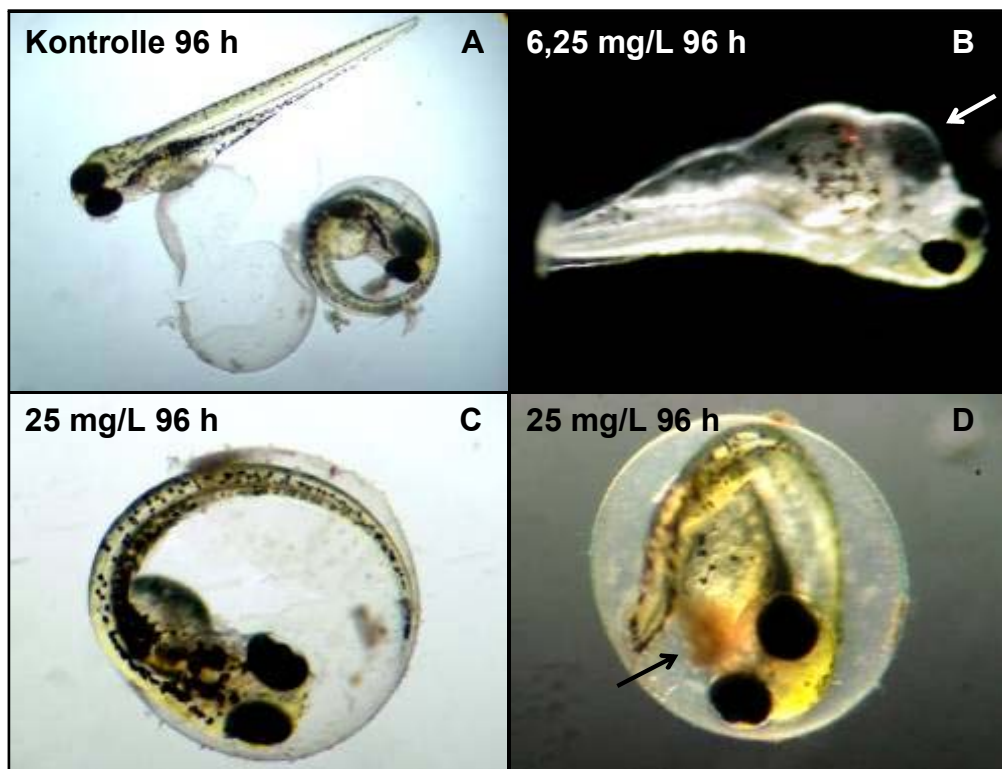


Abb. 2.12: Beobachtungen nach 96 h Expositionszeit gegenüber CBZ: A Geschlüpfte Larve einer Kontrolle; B Larve mit perikardialem Ödem (Pfeil) bei 6,25 mg/L (Chorion wurde entfernt); C Larve während des Schlüpfens bei 25 mg/L; D fehlentwickelter Embryo bei 25 mg/L mit einsetzender Koagulation im Bereich des Dottersacks (Pfeil).

In den Kontrollen waren bereits 17 von den insgesamt 37 verbliebenen Larven geschlüpft (Abb. 2.12-A). Alle Larven schienen normal entwickelt. In der niedrigsten Testkonzentration waren 11 von 36 Larven geschlüpft; bei einer noch nicht geschlüpften Larve wurde ein perikardiales Ödem beobachtet (Abb. 2.12-B). Alle übrigen geschlüpften und nicht geschlüpften Larven waren normal entwickelt. In der Konzentrationsstufe 12,5 mg/L waren 10 von 35 Larven geschlüpft, wobei keine Fehlentwicklungen festgestellt werden konnten. In der mittleren Konzentrationsstufe bei 25 mg/L waren 5 der 38 vorhandenen Larven geschlüpft. Ein Embryo dieser Konzentration war fehlentwickelt, eine Koagulation hatte bereits im Bereich des Dottersacks eingesetzt (Abb. 2.12-D). In den beiden höchsten Konzentrationen (50 und 100 mg/L) waren noch keine Larven geschlüpft. Bei 50 mg/L befand sich in einer geöffneten Eihülle eine Larve, die keinen Herzschlag mehr erkennen ließ. Bei 100 mg/L waren keine spontanen Muskelkontraktionen der Embryonen zu erkennen. Bei den nach 96 h Expositionszeit aufgetretenen letalen Effekte (Tab. 2.28) konnten mit dem Signifikanztest *Fischer's Exact*

Binomial Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Testkonzentrationen festgestellt werden. Die $LC_{50/96\text{ h}}$ betrug $> 100\text{ mg/L}$.

Tab. 2.28: Fischembryonen mit letalen Effekten nach 96 h Expositionsdauer gegenüber CBZ.

Nominale Testkonzentration [mg/L]	0	6,25	12,5	25	50	100
Gesamtzahl Embryonen mit letalen Effekten nach 96 h Exposition ¹	3	5	5	3	4	1

¹: perikardiales Ödem wurde als letaler Effekt betrachtet

Schlupfrate nach 96 h Exposition

Unterschiede in der Schlupfrate nach 96 h bei den Testkonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle wurde bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ mittels des *Fischer's Exact Binomial Test* mit dem Statistik Programm ToxRat Professional Version 2.07 ausgewertet. Vor der statistischen Auswertung wurde eine Kompensation des Kontrolleffekts mit der *Abbott's formula* durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle wurde bei der Testkonzentration von 25 mg/L festgestellt (Tab. 2.29).

Tab. 2.29: Anzahl geschlüpfter Larven in den Testkonzentrationen nach 96 h Exposition gegenüber CBZ.

Nominale Testkonzentration [mg/L]	Larven geschlüpft	% von zu Beginn eingesetzten Eiern	% von geschlüpften Larven der Kontrolle
0	17	43	100
6,25	11	28	65
12,5	10	25	59
25	5	13 *	29 *
50	0	0 *	0 *
100	0	0 *	0 *

*: signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$)

Obwohl nur 59% der Larven, welche in den Kontrollen nach 96 h zum schlüpfen, in der Testkonzentration bei 12,5 mg/L schlüpfen (Tab. 2.29), konnte mit dem verwendeten Signifikanztest kein Unterschied dieser Konzentrationsstufe im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Tab. 8.30 im Anhang). Eine Ursache hierfür liegt möglicherweise in der geringen Anzahl an Replikaten. Da der R/s-Test und der Cochran's-Test keine Normalverteilung und keine Varianzhomogenität der Daten feststellten, wurde eine zusätzliche Auswertung mit Hilfe des Williams-Tests nicht durchgeführt. Die NOEC bezüglich der Schlupfrate betrug demnach 12,5 mg/L, die LOEC entsprechend 25 mg/L. Die anschließende Probit-Analyse der Daten ergab eine $EC_{50/96\text{ h Schlupfrate}}$ von 13,3 mg/L. Abb. 2.13 zeigt eine graphische Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Testsubstanzkonzentration und des Anteils nicht geschlüpfter Larven nach 96 h Expositionsdauer im Verhältnis zur Anzahl geschlüpfter Lar-

ven in der Kontrolle, eine ausführliche Darstellung der Einzelwerte und der statistischen Parameter befindet sich im Anhang in Tab. 8.29-Tab. 8.33.

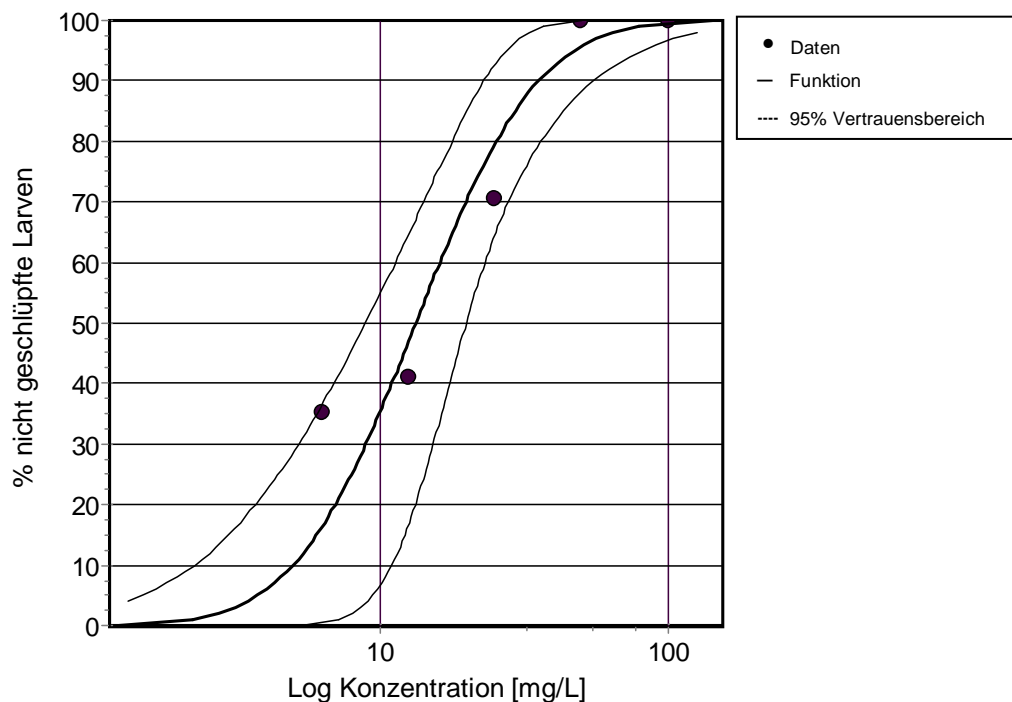


Abb. 2.13: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Testsubstanzkonzentration (CBZ) und des Anteils nicht geschlüpfter Larven nach 96 h Expositionsdauer im Verhältnis zur Anzahl geschlüpfter Larven in der Kontrolle (Original-Graphik der Probit-Analyse aus dem verwendeten Statistik-Programm).

Herzschlagfrequenz nach 96 h Expositionszeit

Die Herzschlagfrequenz wurde nach 96 h Expositionszeit bei zufällig ausgewählten Embryonen, die sich noch im Chorion befanden, bestimmt. Dabei zeigte sich in den Kontrollen und den niedrigen Testkonzentrationen eine relativ hohe Herzschlagfrequenz um ca. 190 min^{-1} (Tab. 2.30). In den beiden höchsten Konzentrationsstufen nahm die Frequenz ab. Bei der höchsten Testkonzentration (100 mg/L) war die Frequenz etwa nur halb so hoch wie bei den Kontrollen. Abb. 2.14 verdeutlicht die Verlangsamung der Herzschlagfrequenz in den höheren Testkonzentrationen. Eine Darstellung der Einzelwerte befindet sich im Anhang in Tab. 8.34. Eine NOEC-Bestimmung der Herzschlagfrequenz wurde mit einem Mehrfachvergleich mittels des Williams-Tests mit dem Statistik Programm ToxRat Professional Version 2.07 durchgeführt (Tab. 8.35 im Anhang). Die Normalverteilung der Daten und die Homogenität der Varianzen konnten zuvor mit dem R/s-Test und dem Cochran's-Test bestätigt werden. Der Mehrfachvergleich ergab signifikante Unterschiede der Herzschlagfrequenz in den beiden höchsten Konzentrationen, wonach die $\text{NOEC}_{96 \text{ h}}$ bei 25 mg/L und die $\text{LOEC}_{96 \text{ h}}$ bei 50 mg/L festgestellt wurde. Eine mittlere Effektkonzentration (EC_{50}) wurde für diesen Parameter nicht ermittelt, da nicht bekannt ist, wie hoch die minimale zum Überleben notwendige Herzschlagfrequenz bei den Fischembryonen ist.

Tab. 2.30: Durchschnittliche Herzschlagfrequenz [min^{-1}] der Fischembryonen nach 96 h Exposition gegenüber CBZ; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, N = Anzahl Messungen.

Nominale Testkonzentration [mg/L]	MW	SD	N
0	197	12	8
6,25	194	9	4
12,5	198	8	4
25	189	4	4
50	164	24	4
100	98	15	4

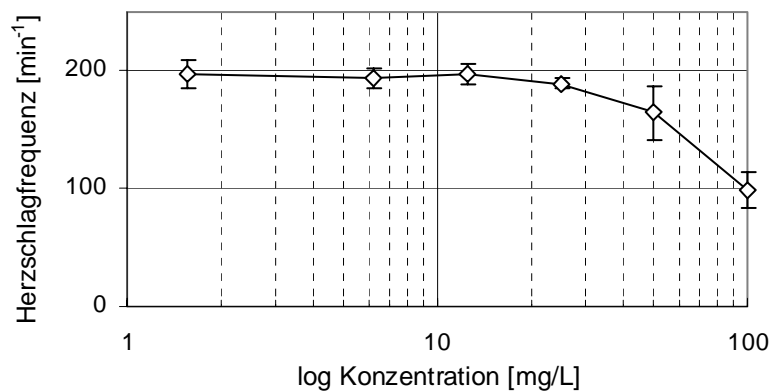


Abb. 2.14: Herzschlagfrequenzen der Fischembryonen nach 96 h Exposition gegenüber CBZ in Abhängigkeit zur Testsubstanzkonzentration (Mittelwerte mit Standardabweichungen; Kontrollen: $n = 8$, sonst: $n = 4$). Der niedrigste Wert auf der Abszisse entspricht der Kontrolle, der zwecks der logarithmischen Auftragung auf $\frac{1}{4}$ der niedrigsten Testkonzentration festgelegt wurde.

Chemische Begleitanalytik

Die Analyse der Testlösungen zeigte eine hohe Wiederfindungsrate der Testsubstanzen (Tab. 2.31). In den Kontrollen wurde keine Testsubstanz nachgewiesen. Im Fischembryo-Test mit SMX betrugen die Abweichungen von den nominal eingesetzten Konzentrationen maximal 2%, im Test mit CBZ wurden maximale Abweichungen von 7% nicht überschritten. Die berechneten Effektkonzentrationen wurden deshalb nicht mit den analytisch gemessenen Konzentrationen korrigiert.

Tab. 2.31: Wiederfindungsraten von SMX und CBZ in den Testlösungen während der Fisch-embryo-Toxizitätstests.

Testsubstanz	Probenahme-zeitpunkt [h]	Nominale Konzentration [mg/L]	Gemessene Konzentration [mg/L]	Wiederfindungsrate [%]
SMX	0	0	< BG	-
	0	100	101	101
	48	0	< BG	-
	48	100	102	102
CBZ	0	0	< BG	-
	0	6,25	6,1	98
	0	25	27	106
	0	100	93	93
	48	0	< BG	-
	48	6,25	6,2	99
	48	25	24	96
	48	100	93	93

BG = Bestimmungsgrenze: 200 ng/L

Zusammenfassung der Fischembryo-Toxizitätstests mit SMX und CBZ

Nach 48 h Expositionsdauer gegenüber der Testsubstanz SMX konnten keine letalen und subletalen Effekte auf Fischembryonen von *D. rerio* festgestellt werden. Nach 72 h waren ebenfalls keine signifikanten durch die Testsubstanz SMX bedingten Effekte auf die Entwicklung der Fischembryonen festzustellen. Die $LC_{50/72\text{ h}}$ für Embryonen von *Danio rerio* beträgt > 100 mg SMX/L (Tab. 2.32).

Im Fischembryo-Toxizitätstest mit CBZ konnten nach der Expositionszeit von 48 h bei den getesteten Konzentrationen keine letalen, durch die Testsubstanz bedingten Effekte festgestellt werden. Nach 96 h wurde die Schlupfrate als empfindlichster Endpunkt mit einer $EC_{50/96\text{ h Schlupfrate}}$ von 13,3 mg/L und einer NOEC von 12,5 mg/L bestimmt. Eine Verlangsamung der Herzfrequenz konnte ebenfalls beobachtet werden. Allerdings lag die NOEC um eine Konzentrationsstufe höher bei 25 mg/L. Obwohl nach 96 h Exposition keine zur Kontrolle signifikant verschiedene letalen Effekte festgestellt wurden, sind die beobachteten subletalen Endpunkte, wie die herabgesetzte Herzschlagfrequenz, verringerte Schlupfrate und das Fehlen spontaner Muskelkontraktionen in der höchsten Konzentrationsstufe, eindeutige Hinweise auf eine maßgebliche Beeinträchtigung der Überlebensfähigkeit der Fischembryonen.

Tab. 2.32: Zusammenfassung der Ergebnisse der Fischembryo-Toxizitätstests mit SMX und CBZ.

Effektkonzentration	Expositionsdauer			
	SMX		CBZ	
	48 h	72 h	48 h	96 h
LC ₅₀	> 100 mg/L	> 100 mg/L	> 100 mg/L	> 100 mg/L
EC ₅₀ Schlupfrate	n.a.	n.a.	n.a.	13,3
EC ₅₀ Herzfrequenz	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
NOEC _{Schlupfrate}	n.a.	n.a.	n.a.	12,5
LOEC _{Schlupfrate}	n.a.	n.a.	n.a.	25
NOEC _{Herzfrequenz}	> 100 mg/L	n.a.	n.a.	25
LOEC _{Herzfrequenz}	-	n.a.	n.a.	50

n.a.: nicht ausgewertet

Zusammenfassung der akuten Toxizitätstests

Drei Organismen wurden in verschiedenen Testverfahren unter Berücksichtigung ihrer trophischen Stellung im Ökosystem für die Prüfung der akuten Toxizität des Antibiotikums Sulfamethoxazol (SMX) und des Antiepileptikums Carbamazepin (CBZ) angewandt: die einzellige Grünalgenart *Scenedesmus subspicatus*, der Süßwasser-Kleinkrebs *Daphnia magna* und der Süßwasserfisch *Danio rerio* sowie dessen Embryonen.

Tab. 2.33: Zusammenfassung der gemessenen EC/LC₅₀-Werte aus den akuten Toxizitätstest mit SMX und CBZ [mg/L].

Testsubstanz	Effekt-konzentration	Expositionsdauer					
		Alge		Daphnie	Fisch	Fischembryo	
		72 h	96 h	48 h	96 h	48 h	96 h
SMX	E _b C ₅₀ ¹	3,16	3,21	-	-	-	-
	E _r C ₅₀ ²	6,6	4,96	-	-	-	-
	EC ₅₀	-	-	125 ³	-	> 100 ⁴	-
	LC ₅₀	-	-	-	> 100	> 100	-
CBZ	EC ₅₀	-	-	-	-	-	13,3 ⁵
	LC ₅₀	-	-	-	35,4	> 100	> 100

¹: Hemmung des Zellwachstums; ²: Hemmung der spezifischen Wachstumsrate; ³: Immobilisierung; ⁴: Verminderung der Herzschlagfrequenz; ⁵: Verminderung der Schlupfrate

Der akute Fisch-Toxizitätstest mit Carbamazepin resultierte in einer LC₅₀ = 35 mg/L, wobei zwischen den benachbarten Testkonzentrationen von 25 und 50 mg/L keine bzw. 100% Mortalität auftraten. Als LC₅₀ wurde deshalb das geometrische Mittel zwischen diesen Konzentrationen bestimmt.

Im Fischembryo-Toxizitätstest mit SMX wurden nach 48 h und 72 h Expositionsdauer keine letalen und subletalen Effekte auf die Fischembryonen von *D. rerio* festgestellt werden. Die $EC/LC_{50/48\text{ h}}$ und $EC/LC_{50/72\text{ h}}$ für Embryonen von *Danio rerio* beträgt $> 100\text{ mg SMX/L}$.

Im Fischembryo-Toxizitätstest mit CBZ konnten anhand der Auswertung der Endpunkte Koagulation (Mortalität), Ausbildung der Somiten, Ablösung des Schwanzes vom Eidotter und Frequenz des Herzschlags nach 48 h Exposition bis zur maximal getesteten Konzentration von 100 mg/L zunächst keine Effekte festgestellt werden, woraufhin die $EC_{50/48\text{ h}}$ auf $> 100\text{ mg/L}$ bestimmt wurde. Durch die Fortführung des Tests konnte allerdings beobachtet werden, dass die Schlupfrate nach 96 h Exposition gegenüber CBZ signifikant im Vergleich zu den Kontrollen beeinträchtigt wurde. Die Schlupfraten nahmen in den steigenden Testkonzentrationen kontinuierlich ab, und in den beiden höchsten Konzentrationsstufen wurde das Schlüpfen der Larven bis nach 96 h Expositionsdauer sogar gänzlich unterdrückt. Auch die Messung der Herzschlagfrequenz als sublethaler Parameter zeigte nach 96 h eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung ($NOEC = 25\text{ mg/L}$). Die biologische Interpretation dieses Parameters gestaltet sich allerdings schwierig, da die für das Überleben notwendige minimale Herzschlagfrequenz der Fischembryonen nicht bekannt ist.

2.2.2 Resultate des Daphnien-Reproduktionstests

O₂-Gehalt, Temperatur und pH

Die Parameter Sauerstoffgehalt, pH und Temperatur zeigten über den gesamten Testzeitraum einen Verlauf mit geringen Schwankungen (Tab. 2.34). Der niedrigste Wert für die Sauerstoffkonzentration lag mit 92% oder $8,0\text{ mg/L}$ über dem erforderlichen Mindestwert von 3 mg/L . Der pH lag mit einem Minimalwert von 7,6 und einem Maximalwert von 8,7 bei allen Konzentrationen durchschnittlich bei 7,9. Die durchschnittliche Medientemperatur lag etwas über 20°C mit einem Minimalwert von $19,8^\circ\text{C}$ und einem Maximalwert von 22°C .

Tab. 2.34: Durchschnittliche Sauerstoffgehalte, pH-Werte und Temperaturen der Testlösungen bei jedem Mediumwechsel im Daphnien-Reproduktionstest mit CBZ. MW = Mittelwert aus pro Konzentration errechneten Durchschnittswerten, SD = Standardabweichung, Min. = niedrigster gemessener Wert, Max. = höchster gemessener Wert, N = Anzahl Messungen.

Parameter		MW	SD	N	Min.	Max.	N
O ₂ [%]	a.	103,3	2,1	6	94	111	49
	n.	97,4	1,3	6	92	101	50
O ₂ [mg/L]	a.	9,2	0,2	6	8,4	9,9	49
	n.	8,6	0,2	6	8,0	9,1	50
pH	a.	7,8	0,1	6	7,6	8,7	49
	n.	8,0	0,03	6	7,8	8,1	50
Temp. [°C]	a.	20,4	0,1	6	20,0	21,1	49
	n.	20,7	0,2	6	19,8	22,0	50

a.: alt - im Test gebrauchte Testlösungen vor Mediumwechsel;

n.: neu - frische Testlösungen nach Mediumwechsel

Die höchsten Temperaturen waren in frischen Testmedien gemessen worden. Die im Test gebrauchten Medien zeigten allerdings eine geringe Schwankung in engen Grenzen zwischen 20,0 und 21,1°C. Außer den Temperaturmessungen der Testmedien, die 3-mal wöchentlich beim Mediumwechsel durchgeführt wurden, wurde die Raumtemperatur von einem Thermo-Hygrometer permanent erfasst. Dieser zeigte eine maximale Schwankung von 2°C. Eine Auflistung der Werte der Messungen in den einzelnen Testkonzentrationen befindet sich im Anhang (Tab. 8.36).

Auswertungen der biologischen Parameter

1. Reproduktionsleistung

In den Kontrollen wurden durchschnittlich 129 ± 23 lebende Nachkommen pro Daphnie gezählt, womit die Anforderung von mindestens 60 lebenden Nachkommen pro Daphnie erfüllt wurde (Tab. 2.35). Ab dem 8. Tag nach Expositionsbeginn begannen die Daphnien Jungtiere freizusetzen. Im Rhythmus von 3 Tagen wurde von den meisten Daphnien eine neue Brut freigesetzt, sodass während der gesamten Expositionszeit 4-5 Reproduktionszyklen durchlaufen wurden. Dieses Schema war allerdings bei einigen Daphnien in der mittleren Konzentrationsstufe bei 4 mg/L etwas gestört, d.h. es gab Verschiebungen zwischen den Abständen der einzelnen Bruten oder die erste Brut wurde verzögert hervorgebracht. In der darüber liegenden Konzentrationsstufe bei 12,6 mg/L war kein regelmäßiges Schema des Hervorbringens von Bruten zu erkennen. In der höchsten Testkonzentration bei 40 mg/L wurden keine Nachkommen produziert. In allen Konzentrationen wurden abgeworfene Eier beobachtet, wobei allerdings keine Konzentrations-Wirkungsbeziehung zu erkennen war. Die Anzahl der bis Testende überlebenden und der von ihnen produzierten lebenden Nachkommen jeder Konzentrationsstufe ist in Tab. 2.35 dargestellt. Eine detaillierte Übersicht über die Nachkommen-schaft jeder einzelnen Daphnie enthält Tab. 8.37 im Anhang.

Tab. 2.35: Anzahl an von überlebenden Daphnien produzierten Nachkommen. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Nominale Konzentration [mg/L]	Anzahl Daphnien bei Testbeginn	überlebende Daphnien bei Testende	Summe Nachkommen pro Konzentration	MW Nachkommen pro Daphnie	SD
0	12	12	1543	129	23
0,4	12	12	1453	121	19
1,26	12	12	1249	104 *	17
4,0	12	11	958	87 *	22
12,6	12	4	143	36 *	16
40	12	0	0	0 *	0

* = signifikant verschieden zur Kontrolle ($p \leq 0,05$)

Die Cochran's-Varianzanalyse und der Bartlett-Box-Test (univariate Homogenität) ergaben eine homogene Gleichverteilung der Varianzen (Tab. 8.38 im Anhang). Der daraufhin durchgeführte Mehrfachvergleich mit dem Dunnett-T-Test ergab bei einem Signifikanzniveau von

$\alpha = 5\%$ bis zur zweitniedrigsten Testkonzentration (1,26 mg/L) signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 2.36). Entsprechend liegen die NOEC bezüglich der Reproduktionsleistung bei 0,4 mg/L und die LOEC bei 1,26 mg/L.

Tab. 2.36: Mehrfachvergleich: Dunnett-T-Test, zweiseitig, gegen Kontrolle. Abhängige Variable: Anzahl Nachkommen pro überlebender Daphnie.

Nominale Testkonzentration [mg/L]	Mittlere Differenz (abhängige Variable)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
0,4	-7,5	8,1	0,776	-28,0	13,0
1,26	-24,5 *	8,1	0,014	-45,0	-4,0
4,0	-41,5 *	8,2	0,000	-62,4	-20,6
12,6	-92,8 *	11,4	0,000	-121,8	-63,9

*: Die mittlere Differenz ist auf der Stufe 0,05 signifikant.

Die mittlere Effektkonzentration EC_{50} bezüglich der Reproduktionsleistung wurde mittels nichtlinearer Regressionsanalyse ermittelt und die Ergebnisse im logarithmischen Maßstab graphisch dargestellt (Abb. 2.15). Die Berechnung ergab eine $EC_{50/21\text{ d}} = 6,6\text{ mg/L}$.

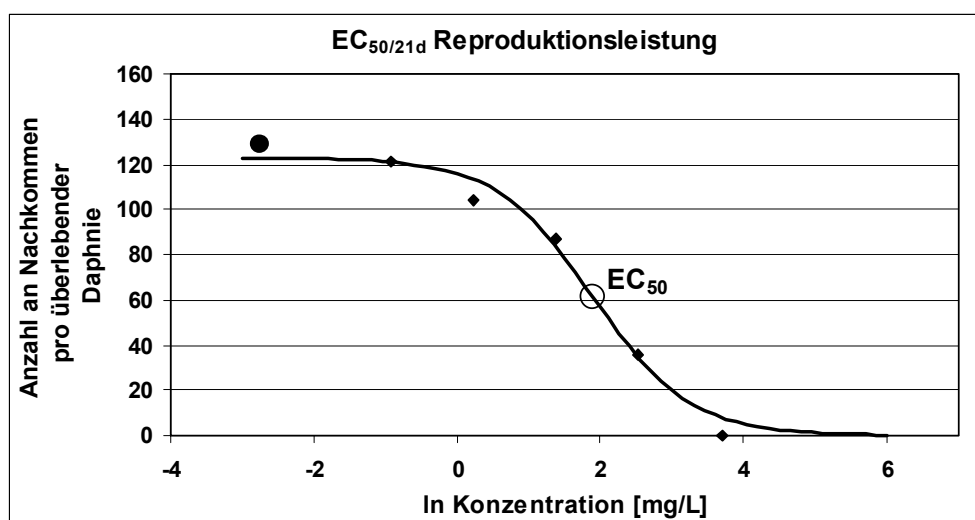


Abb. 2.15: Graphische Darstellung der nichtlinearen Regressionsanalyse zur Errechnung der mittleren Effektkonzentration $EC_{50/21\text{ d}}$ bezüglich der Reproduktionsleistung in Abhängigkeit zur Testkonzentration (CBZ). Der schwarze Punkt (●) entspricht der Kontrolle, die zwecks der logarithmischen Auftragung auf 0,06 mg/L festgelegt wurde.

2. Körperlänge

Die Körperlängen aller bis zum Testende überlebenden Daphnien wurden mit Hilfe eines skalierten Objektträgers bestimmt. Abb. 2.16 zeigt beispielhaft je eine Daphnie der Kontrolle und der mittleren Testkonzentration (4 mg/L). Über die 2 mm-Skalierung auf dem Objektträger konnten die tatsächlichen Körperlängen der Daphnien errechnet werden. Tab. 2.37 enthält eine Übersicht über die durchschnittlichen Körperlängen der Daphnien in den Kontrollen und Testkonzentrationen. Eine Auflistung der Einzelwerte befindet sich im Anhang in Tab. 8.39.

Die statistische Auswertung des Parameters Körperlänge wurde entsprechend dem für die Auswertung der Reproduktionsleistung verwendeten Verfahren durchgeführt. Details zur statistischen Auswertung befinden sich im Anhang in Tab. 8.40-Tab. 8.42.

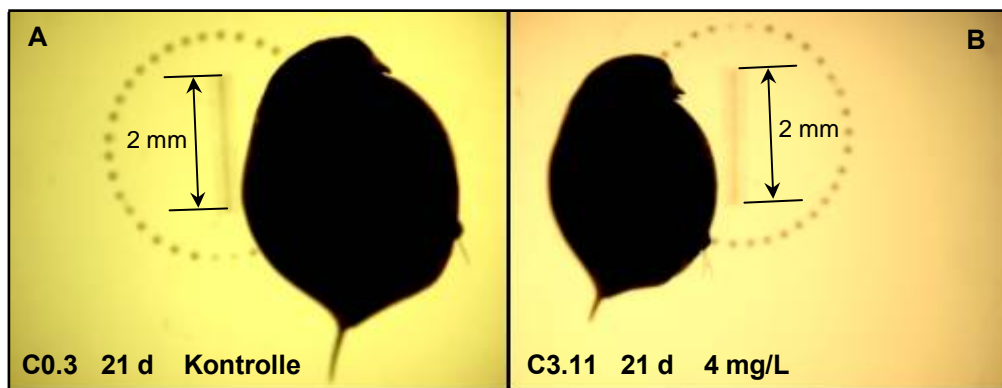


Abb. 2.16: Größenvermessung der Daphnien unter dem Binokular bei 20-facher Vergrößerung; beispielhaft je eine Daphnie aus der Kontrolle (A) und der mittleren Testkonzentration bei 4 mg/L (B) nach 21 d Expositionszeit.

Die Cochran's-Varianzanalyse und der Bartlett-Box-Test (univariate Homogenität) ergaben eine homogene Gleichverteilung der Varianzen. Die Mehrfachvergleiche nach dem Dunnett-T-Test resultierten ab der zweitniedrigsten Konzentration (1,26 mg/L) in signifikanten Unterschieden zur Kontrolle ($p \leq 0,05$). Somit stimmten die für die Körperlängen ermittelte NOEC = 0,4 mg/L und die LOEC = 1,26 mg/L mit den für die Reproduktionsleistung ermittelten Werten überein.

Tab. 2.37: Durchschnittliche Körperlänge der bis zu Testende überlebenden Daphnien. N = Anzahl überlebender Daphnien, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Nominale Testkonzentration [mg/L]	N	Körperlänge (ohne Afterstachel) [mm]	
		MW	SD
0,0	12	4,30	0,12
0,4	12	4,22	0,11
1,3	12	4,08 *	0,13
4,0	11	3,77 *	0,19
12,6	4	3,30 *	0,15
40	0	n. b.	n. b.

*: signifikant verschieden zur Kontrolle ($p \leq 0,05$)

n. b. = nicht bestimmt

3. Immobilität (Mortalität)

In den Kontrollen traten bis zu Testende keine Mortalitäten auf. Alle Daphnien in der höchsten Testkonzentration (40 mg/L) waren bereits nach 11 Tagen Expositionszeit immobil, ohne bis dahin Nachkommen freigesetzt zu haben (Tab. 2.35 und Tab. 8.37). In der zweithöchsten Testkonzentration waren bei Testende zwei Drittel der Daphnien immobil, in der darunter

liegenden Konzentration (4 mg/L) nur eine von den 12 zu Beginn eingesetzten Daphnien. Die Effektkonzentrationen EC_x wurden mittels Probit-Analyse berechnet. Statistische Parameter der Probit-Analyse sind detailliert im Anhang in Tab. 8.43 und Tab. 8.44 dargestellt. Die mittlere Effektkonzentration bezüglich der Immobilität $EC_{50/21\text{ d}}$ betrug 9,4 mg/L, die $EC_{10/21\text{ d}}$ und die $EC_{90/21\text{ d}}$ betrugen 4,4 bzw. 20,0 mg/L. Die Mortalitätsrate von 8,3% in der Testkonzentration von 4 mg/L liegt innerhalb des für die Kontrollen zulässigen Validitätskriteriums von 20% Mortalität. Entsprechend ist die Konzentrationsstufe von 4 mg/L die $NOEC_{\text{Immobilität}}$. Die $LOEC_{\text{Immobilität}}$ ist demnach die darüber liegende Testkonzentration von 12,6 mg/L mit einer Mortalitätsrate von 66%.

Chemische Begleitanalytik

Die Analyse der Proben aus den Testlösungen zeigte während der gesamten Testperiode in allen gemessenen Konzentrationen eine hohe Wiederfindungsrate der Testsubstanz CBZ (Tab. 2.38). In den Kontrolllösungen wurde keine Testsubstanz nachgewiesen. In den im Test gebrauchten Testmedien, denen die Daphnien jeweils 2 Tage exponiert waren, konnte keine Abnahme der Testsubstanz beobachtet werden. Da die gemessenen Testkonzentrationen innerhalb eines Schwankungsbereichs von $\pm 11\%$ der Nominalkonzentrationen lagen, wurden die berechneten Effektkonzentrationen nicht mit den gemessenen Konzentrationen korrigiert.

Tab. 2.38: Wiederfindungsraten von CBZ in den frisch angesetzten und gebrauchten Testlösungen während des Daphnien-Reproduktionstests.

Probenahmezeitpunkt [d]	Testlösung	Nominale Konzentration [mg/L]	Gemessene Konzentration [mg/L]	Wiederfindungsrate [%]
0	frisch	0	< BG	-
		0,4	0,36	89
		4	3,7	93
		40	36,9	92
2	gebraucht	0	< BG	-
		0,4	0,38	95
		4	4,0	100
		40	37,7	94
7	frisch	0	< BG	-
		0,4	0,38	95
		4	3,8	96
		40	39,2	98
9	gebraucht	0	< BG	-
		0,4	0,39	98
		4	4,0	100
		40	39,5	99
14	frisch	0	< BG	-
		0,4	0,39	98
		12,6	12,6	100
16	gebraucht	0	< BG	-
		0,4	0,41	102
		12,6	12,2	97

BG = Bestimmungsgrenze: 200 ng/L

Zusammenfassung der Ergebnisse des Daphnien-Reproduktionstests

Die Ergebnisse des Daphnien-Reproduktionstests sind zusammenfassend in Tab. 2.39 dargestellt. Als empfindlichster Parameter erwiesen sich gleichermaßen die Reproduktionsleistung und die Körperlänge der Daphnien mit einer NOEC = 0,4 mg/L.

Tab. 2.39: Effektkonzentrationen und NOEC/LOEC-Werte für die ausgewerteten Parameter im Daphnien-Reproduktionstest mit CBZ.

Effektkonzentration [mg/L]	Parameter		
	Immobilität (Mortalität)	Reproduktionsleistung	Körperlänge
EC _{10/21 d}	4,4	-	-
EC _{50/21 d}	9,4	6,6	-
EC _{90/21 d}	20,0	-	-
NOEC _{21 d}	4,0	0,4	0,4
LOEC _{21 d}	12,6	1,26	1,26

2.2.3 Resultate der Sediment-Toxizitätstests

O₂-Gehalt, Temperatur und pH

Der Sauerstoffgehalt, die Temperatur und der pH des Testmediums wurden jeweils bei Testbeginn vor dem Einsetzen der Würmer und während des gesamten Versuchszeitraumes in regelmäßigen Abständen in mehreren Testgefäßen pro Konzentrationsstufe gemessen. Tab. 2.40 enthält eine Übersicht über die Durchschnittswerte dieser Parameter während des Testverlaufs, eine Auflistung der Einzelmessungen beider Tests befindet sich im Anhang in Tab. 8.45 und 8.46.

Tab. 2.40: Durchschnittliche Sauerstoffgehalte, pH-Werte und Temperaturen des überstehenden Wassers während des Testzeitraums in den Sediment-Toxizitätstests mit EE2 und AHTN. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, Min. = niedrigster gemessener Wert, Max. = höchster gemessener Wert, N = Anzahl Messungen.

Testsubstanz	Parameter	MW	SD	Min.	Max.	N
EE2	O ₂ [%]	93	4,6	82	100	66
	O ₂ [mg/L]	8,6	0,5	7,6	9,3	66
	pH	8,1	0,1	7,7	8,2	66
	Temp. [°C]	19,1	0,3	18,5	19,8	66
AHTN	O ₂ [%]	91	2,4	82	96	63
	O ₂ [mg/L]	8,1	0,2	7,2	8,6	63
	pH	7,7	0,5	5,8	8,1	63
	Temp. [°C]	21,1	0,6	20,0	21,7	63

In beiden Sediment-Toxizitätstests lag der Sauerstoffgehalt des überstehenden Wassers während des gesamten Versuchszeitraumes in allen Konzentrationen über 80% der Sättigung. Die Temperatur zeigte geringe Schwankungen innerhalb der Tests, wobei der Test mit EE2 bei einer etwas

niedrigeren Temperatur von $19,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$ stattfand, und der Test mit AHTN bei $21,1 \pm 0,6^\circ\text{C}$. Der pH blieb im Test mit EE2 über den gesamten Versuchszeitraum sehr stabil zwischen 7,7 und 8,2.

Im Test mit AHTN fiel der pH während der letzten Testwoche in einigen Testgefäßen von zuvor 7,8-8,0 in nur wenigen Tagen auf bis zu 5,8 ab (vgl. Tab. 8.46 im Anhang). Bei manchen Replikaten erreichte der pH-Wert bei Testende einen Tiefstwert von 5,5, in anderen konnte nach einem zwischenzeitlichen Abfall ein leichter Anstieg gegen Testende beobachtet werden. Bei Testende war in allen Testkonzentrationen ein durchschnittliches Absinken des pH-Wertes zu beobachten, wobei allerdings keine Dosis-Wirkungsbeziehung festgestellt werden konnte. In etwa der Hälfte aller Replikate sank der pH auf unter 7,0. In 7 von 32 Replikaten lag der pH unter 6,0.

Um zu überprüfen, ob die Änderung des Säuregrades im Medium eventuell auf Sauerstoffmangel im Sediment und einer dadurch bedingten Änderung der Mikrofauna beruhte, wurde in verschiedenen Replikaten mit niedrigen und hohen pH-Werten das Redoxpotenzial im Sediment gemessen (pH-Meter CG 840, Hamilton Special Sensor, Schott, Mainz). Durch die Größe des Redoxpotenzials im Sediment ergibt sich ein Anhaltspunkt auf dessen Sauerstoffversorgung. Die Messungen zeigten unabhängig vom im Wasser gemessenen pH ein positives Redoxpotenzial im überstehenden Wasser von meist über +200 mV und ein negatives zu weniger als -300 mV im Sediment (Tab. 2.41). Daraus lässt sich schließen, dass ein Sauerstoffdefizit im Sediment eine natürliche Erscheinung ist und die Tiere dadurch nicht beeinträchtigt werden. Eine Ursache für das gegen Testende beobachtete Absinken des pH-Wertes im überstehenden Wasser einiger Testgefäße konnte nicht festgestellt werden.

Tab. 2.41: Sediment-Toxizitätstest mit AHTN: Physikalische und chemische Parameter in Replikaten mit unterschiedlichen pH-Werten im überstehenden Wasser bei Testende.

Nominale Konzentration [mg/kg]	Replikat- codierung	pH	Temperatur [°C]	O ₂ im Wasser		Redoxpotenzial [mV]	
				[%]	[mg/L]	Wasser	Sediment
0	SC1	5,7	22,1	115	10,2	+ 260	- 309
0	SC2	7,5	22,9	123	10,3	+ 115	- 354
6,25	C1.3	5,7	22,1	111	9,6	+ 137	- 302
6,25	C1.4	7,8	22,3	116	9,9	+ 252	- 341
25	C3.3	7,9	22,2	121	10,2	+ 267	- 329
25	C3.4	5,8	22,2	116	9,9	+ 286	- 312
100	C5.1	6,5	22,2	117	10,0	+ 290	- 319

Beobachtungen während des Sediment-Toxizitätstests mit EE2

Ein Tag nach Expositionsbeginn waren die meisten Würmer in das Sediment eingegraben. Lediglich in der höchsten Testkonzentration lagen mehrere Würmer in einem Knäuel auf der Sedimentoberfläche. Nach drei Tagen waren alle Würmer in das Sediment eingegraben. Vier Tage nach Expositionsbeginn waren in vielen Replikaten aller Testkonzentrationen Kotpellets (Exkrementa der Würmer) auf den Sedimentoberflächen zu erkennen, was auf einen regen

Metabolismus der Tiere schließen lässt. Bei Testende waren allerdings in der höchsten Testkonzentration (100 mg/kg) deutlich weniger Kotpellets auf der Sedimentoberfläche vorhanden als in den anderen Testkonzentrationen.

Beobachtungen während des Sediment-Toxizitätstests mit AHTN

Tab. 2.42: Sediment-Toxizitätstest mit AHTN: Prozentualer Anteil in das Sediment eingegrabener Würmer während der ersten 3 Expositionstage.

Nominale Konzentration [mg/kg]	Replikat	Prozentualer Anteil eingegrabener Würmer nach Expositionszeit:			
		16 h	24 h	36 h	72 h
0	C0.1	100	100	100	100
	C0.2	100	100	100	100
	C0.3	100	100	100	100
	C0.4	100	100	100	100
0	SC1	100	100	100	100
	SC2	100	100	100	100
	SC3	100	100	100	100
	SC4	100	100	100	100
	SC5 ¹	100	100	100	100
6,25	C1.1	100	100	100	100
	C1.2	100	100	100	100
	C1.3	100	100	100	100
	C1.4	100	100	100	100
	C1.5 ¹	100	100	100	100
12,5	C2.1	100	100	100	100
	C2.2	100	100	100	100
	C2.3	100	100	100	100
	C2.4	100	100	100	100
25	C3.1	100	100	90	100
	C3.2	0	70	90	100
	C3.3	0	100	100	100
	C3.4	100 [*]	100 [*]	100 [*]	100 [*]
	C3.5 ¹	100	100	100	100
50	C4.1	0	0	10	100
	C4.2	100 [*]	100 [*]	100 [*]	100 [*]
	C4.3	100 [*]	100 [*]	100 [*]	100 [*]
	C4.4	100 [*]	100 [*]	100 [*]	100 [*]
100	C5.1	0	100 [*]	100 [*]	100 [*]
	C5.2	0	0	0	100 [*]
	C5.3	0	100 [*]	100 [*]	100 [*]
	C5.4	0	0	0	100 [*]
	C5.5 ¹	0	0	0	20

*: Die Würmer hatten sich alle gemeinsam an nur einer Stelle des Sediments eingegraben.

¹: Die jeweils fünften Replikate wurden zwecks Probenahme für die chemische Begleitanalytik geführt und gingen nicht in die Auswertung der biologischen Parameter mit ein.

24 h nach Expositionsbeginn wurde beobachtet, dass in den 3 höchsten Testkonzentrationen einige Würmer das Sediment vermieden und sich nicht darin vergruben. Daraufhin wurden mit einem Edelstahlspatel vorsichtig Rillen in die Sedimentoberfläche gezogen, um so den

Würmern das Eingraben zu erleichtern. Diese Rillen wurden von manchen Würmern genutzt, um sich an solchen Stellen einzugraben, jedoch kamen einige Würmer wieder aus dem Sediment heraus. Dabei fiel auf, dass in den meisten Replikaten, in denen solche Rillen gezogen wurden, die Würmer sich alle gemeinsam an ein und derselben Stelle des Sediments vergruben. 36 h nach Expositionsbeginn waren in einem Replikat der zweithöchsten und drei Replikaten der höchsten Testkonzentration die Würmer noch immer nicht vergraben. Erst nach 72 h Expositionszeit waren fast alle Würmer im Sediment eingegraben (Tab. 2.42). Nach 3 Tagen Expositionsdauer waren auf der Oberfläche der Sedimente in einigen Testgefäßen Kotpellets zu erkennen. In den Gefäßen der höchsten Testkonzentration waren allerdings deutlich weniger Kotpellets auf der Sedimentoberfläche zu sehen, als in allen anderen Testgefäßen. Diese Beobachtung blieb über den Testzeitraum von 28 Tagen konstant.

Auszählung und Kategorisierung der Würmer bei Testende

Bei Testende wurde die Anzahl der Würmer in jedem Replikat gezählt und die Würmer wie oben beschrieben in verschiedene Kategorien eingeteilt. Nach dem Auszählen wurden sie getrocknet und daraufhin ihre Biomasse bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2.43 dargestellt. Für eine übersichtlichere Darstellung wurden die Werte in Balkendiagramme übertragen (Abb. 2.17).

Ein Vergleich der Replikate mit niedrigem pH im überstehenden Wasser und der Anzahl der Würmer dieser Replikate ließ keine Korrelation dieser Parameter erkennen. Es kamen sowohl Replikate mit niedrigem pH als auch mit hohem pH und geringer Anzahl an Würmern vor (z.B. bei 6,25 mg/kg mit 14 Würmern bei pH 5,7 oder bei 25 mg/kg mit 14 Würmern bei pH 8,0). Andererseits gab es Replikate mit niedrigem pH und trotzdem relativ vielen Würmern (z.B. bei 25 mg/kg mit 17 Würmern bei pH 6,0).

Tab. 2.43: Anzahl Würmer in verschiedenen Teilungszuständen pro Replikat und Biomasse bei Testende (28 d) als Mittelwerte jeder Konzentrationsstufe (Standardabweichungen in Klammern, n = 4).

Testsubstanz	Nominale Konzentration [mg/kg]	Anzahl Würmer pro Replikat	Adulte (ungeteilte) Würmer	Würmer mit neuen Enden pro Replikat	Biomasse pro Replikat [mg TG]	Biomasse pro Wurm [mg TG]
EE2	0	24,0 (1,2)	3,3 (2,2)	20,8 (3,3)	21,2 (2,6)	0,88 (0,12)
	0 (SC) ¹	21,5 (1,3)	2,3 (1,0)	19,3 (2,2)	14,5 (0,6)	0,68 (0,07)
	1,0	28,3 (3,3)	2,0 (1,8)	26,3 (5,0)	24,9 (2,4)	0,88 (0,03)
	3,16	26,3 (1,7)	2,0 (1,2)	24,3 (2,8)	22,2 (4,1)	0,88 (0,14)
	10	24,8 (3,5)	2,8 (1,0)	22,0 (4,2)	21,9 (1,0)	0,91 (0,15)
	31,6	24,5 (3,1)	3,3 (1,5)	21,3 (4,6)	23,0 (2,8)	0,94 (0,11)
	100	10,0 (0,8)*	7,3 (2,2)*	2,8 (2,2)*	12,0 (2,8)*	1,19 (0,22)*
AHTN	0	22,3 (3,3)	4,5 (1,3)	17,8 (3,5)	21,8 (5,3)	0,97 (0,09)
	0 (SC) ¹	14,8 (1,5)	3,0 (0,8)	11,8 (1,3)	13,9 (4,0)	0,94 (0,26)
	6,25	15,8 (4,8)	2,3 (0,5)	13,5 (4,4)	13,0 (5,9)	0,80 (0,13)
	12,5	21,8 (1,0)	2,3 (1,5)	19,5 (2,4)	25,4 (5,0)	1,17 (0,25)
	25	17,0 (2,4)	0,8 (1,0)	16,3 (2,6)	14,1 (4,2)	0,82 (0,17)
	50	17,3 (2,6)	1,8 (0,5)	15,5 (2,6)	15,4 (5,2)	0,88 (0,19)
	100	10,0 (0,8)*	9,3 (1,0)*	0,8 (1,5)*	5,6 (1,2)*	0,56 (0,09)*

¹: SC = Lösungsmittelkontrolle (*solvent control*); *: signifikant verschieden zur Kontrolle ($p \leq 0,05$)

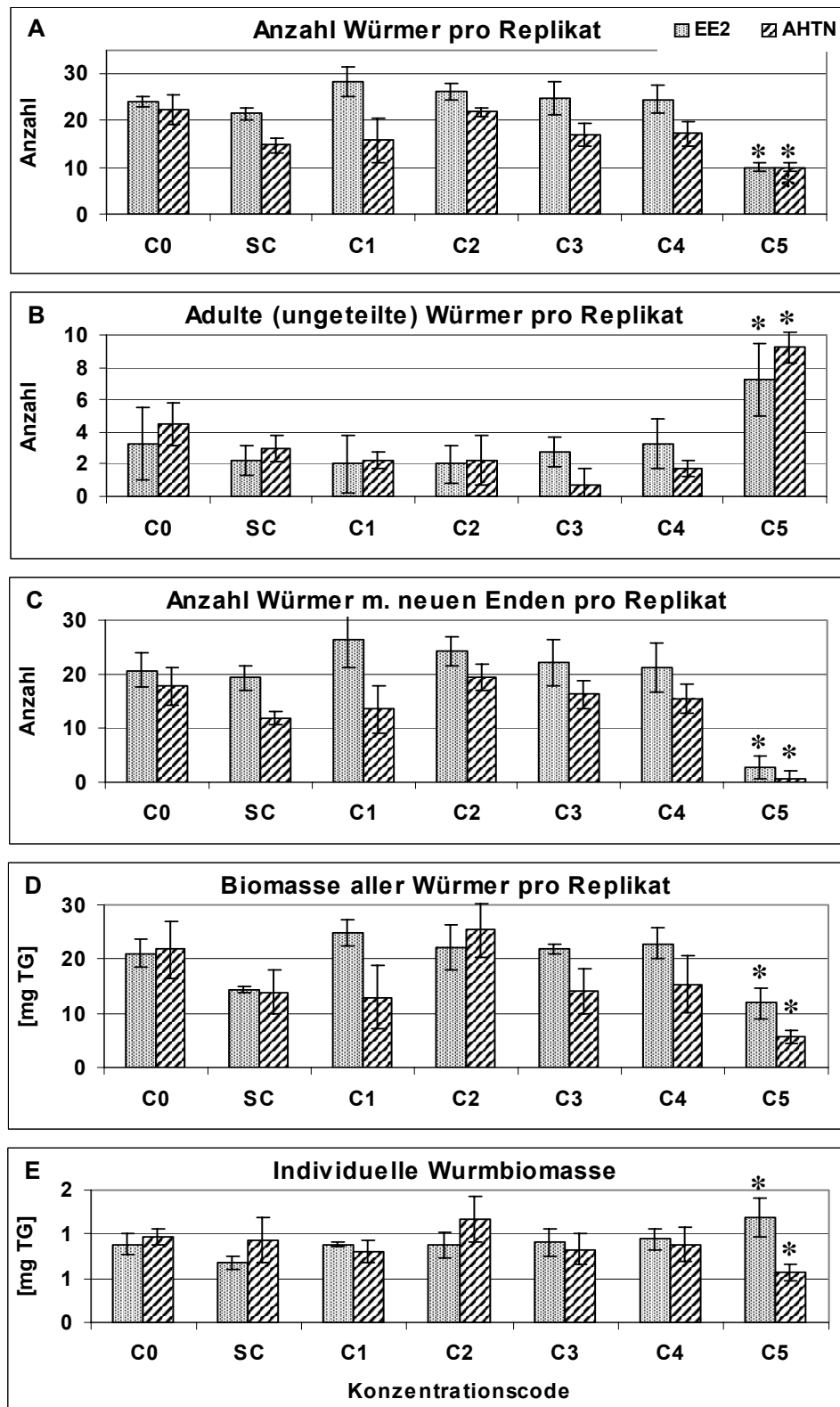


Abb. 2.17 A-E: Ergebnisse der ausgewerteten Parameter in den Sediment-Toxizitätstests mit EE2 und AHTN; Mittelwerte mit Standardabweichungen (n = 4); C0 = Kontrollen, SC = Lösungsmittelkontrollen; C1-C5 (EE2) = 1,0; 3,16; 10; 31,6; 100 mg/kg TG Sediment; C1-C5 (AHTN) = 6,25; 12,5; 25; 50; 100 mg/kg TG Sediment (Nominale Testkonzentrationen); signifikante Unterschiede zu den Kontrollen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Auswertung des Sediment-Toxizitätstests mit EE2

Zunächst wurden die bestimmten Parameter in den Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen unter Verwendung des Statistikprogramms ToxRat Professional Version 2.07 auf Unterschiede überprüft. Der R/s-Test und der Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung zeigten die Normalverteilung der Daten, außer im Parameter „Anzahl Würmer pro Replikat“, der im R/s-Test keine Normalverteilung in den Kontrollen aufwies. Der Cochran's-Test zeigte außer im Parameter „Biomasse pro Replikat“ bei allen ausgewerteten Parametern eine homogene Gleichverteilung der Varianzen. Ein daraufhin durchgeführter Student-t-Test für homogene Varianzen zeigte allerdings signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Lösungsmittelkontrollen im Parameter „Anzahl Würmer pro Replikat“, sowie in den Gesamtbiomassen pro Replikat und in den individuellen Biomassen pro Wurm. Aus diesem Grund sollten die Ergebnisse der in den Testkonzentrationen ausgewerteten Parameter gegen die Lösungsmittelkontrollen verglichen werden, um so eventuell vorhandene Effekte durch das Lösungsmittel in der statistischen Auswertung zu berücksichtigen. Da jedoch in allen außer der höchsten Testkonzentration ein durchschnittlich gleich großes oder größeres Wachstum der Würmer beobachtet wurde wie in den Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen, ist zwecks der Bestimmung der NOEC und LOEC für die beobachteten Parameter ein Vereinen der Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen zu rechtfertigen.

Dementsprechend wurden die Daten zu den bestimmten Parametern auf Normalverteilung und Varianzhomogenität mit dem R/s-Test und dem Cochran's-Test analysiert. Danach waren die Daten normalverteilt und die Varianzen homogen. Zur Bestimmung der NOEC und LOEC wurde für jeden Parameter ein Mehrfachvergleich der vereinten Kontrollen mit den Testkonzentrationen nach Dunnett durchgeführt, der einheitlich in signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zu den vereinten Kontrollen in der höchsten Testkonzentration bei 100 mg/kg resultierte (Tab. 2.43, Abb. 2.17, Tab. 8.48 im Anhang).

Die Effekte zeigten sich am deutlichsten in der Anzahl der Würmer pro Replikat, die in der höchsten Testkonzentration bei der zu Testbeginn eingesetzten Anzahl von 10 Würmern blieb (Tab. 2.43). Die hohe Zahl adulter ungeteilter Würmer und die geringe Anzahl an Würmern mit regenerierten Enden zeigen, dass eine sehr begrenzte Teilungsaktivität in dieser Konzentrationsstufe stattgefunden hat. Entsprechend der geringen Anzahl an Würmern in der höchsten Testkonzentration ist auch die Wurmbiomasse pro Testgefäß signifikant niedriger als in den vereinten Kontrollen. Allerdings zeigte sich bei der individuellen Wurmbiomasse ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen in entgegengesetzter Richtung, also in einer größeren Biomasse pro Wurm in der höchsten Testkonzentration. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsweise, dass eine Zunahme der Biomasse der einzelnen Würmer stattgefunden hat, sondern dass auf Grund der reduzierten Teilungsaktivitäten der Würmer die individuelle Wurmbiomasse im Verhältnis zu den Kontrollen größer ausfiel. Die verringerten Teilungsaktivitäten und die niedrigere Biomasseproduktion in der höchsten Testkonzentration spiegeln sich wider in der Beobachtung der über den Testzeitraum konstanten Zunahme von Kotpellets auf den Sedimentoberflächen in allen außer der höchsten Testkonzentration.

In den Testkonzentrationen 1 - 31,6 mg/kg traten bei den ausgewerteten biologischen Parametern keine zur Kontrolle signifikanten Unterschiede auf. Daher wurde die NOEC bei 31,6 mg EE2/kg TG Sediment und die LOEC bei 100 mg EE2/kg TG Sediment festgestellt (Tab. 2.45).

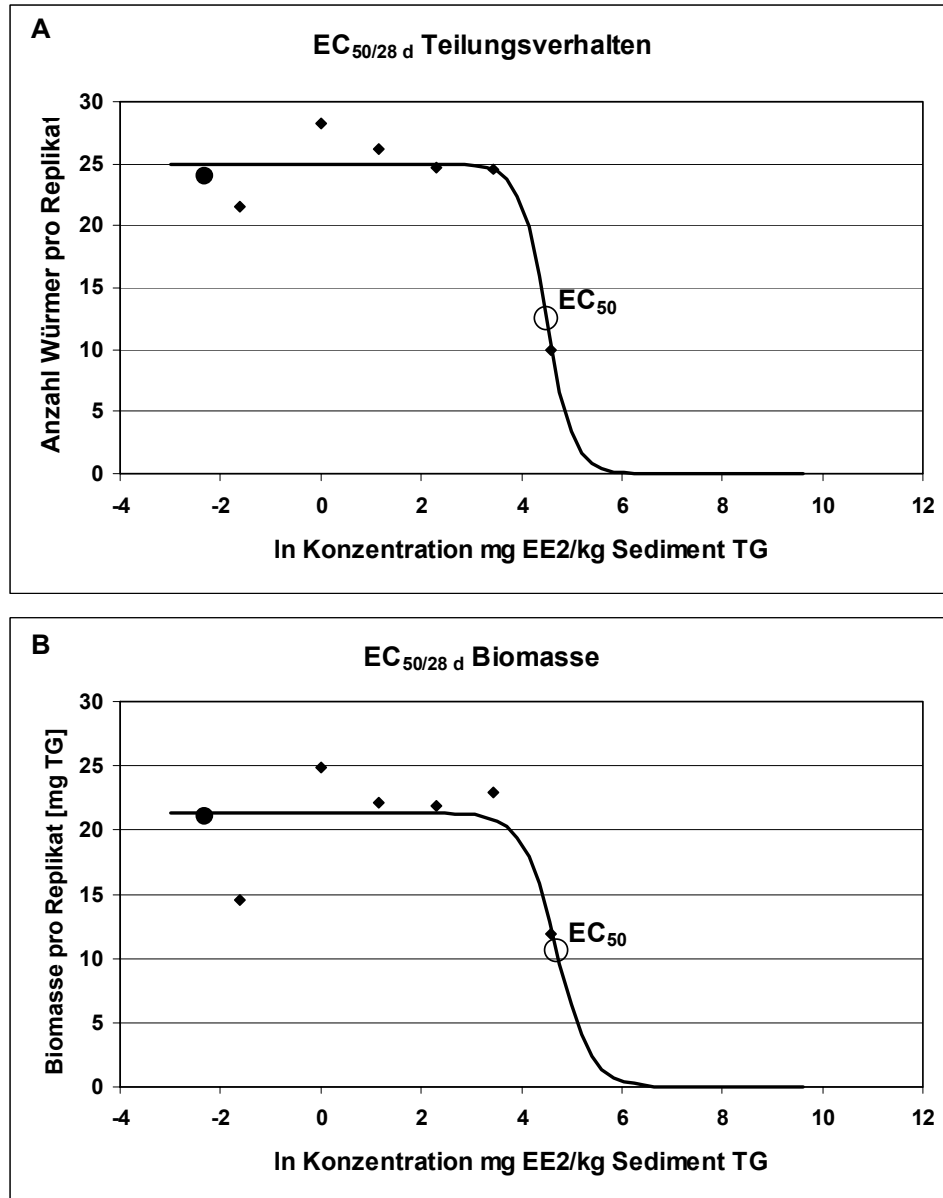


Abb. 2.18: Sediment-Toxizitätstest mit EE2: Graphische Darstellung der Regressionsberechnung zur Ermittlung der mittleren Effektkonzentrationen EC_{50} bezüglich des Teilungsverhaltens (A) und der Biomasse (B). Der schwarze Punkt (●) entspricht der Kontrolle und der auf der Abszisse darauf folgende Messpunkt der Lösungsmittelkontrolle, die zwecks der logarithmischen Auftragung auf 0,1 bzw. 0,2 mg/kg TG festgelegt wurden.

Die mittlere Effektkonzentration EC_{50} wurde mittels logistischer Regressionsberechnung ermittelt und graphisch dargestellt (Abb. 2.18). Als Berechnungsgrundlage dienen die Parameter „Anzahl Würmer pro Replikal“ (Teilungsverhalten) und „Wurmbiomasse pro Replikal“

(Biomasse). Daraus resultierten mittlere Effektkonzentrationen von $EC_{50/28 \text{ d Teilungsverhalten}} = 89,9 \text{ mg/kg}$ und $EC_{50/28 \text{ d Biomasse}} = 110,1 \text{ mg/kg}$ (Tab. 2.45).

Chemische Begleitanalytik

Die Analysen der EE2-Konzentrationen in den Testmedien zeigten uneinheitliche Wiederfindungsraten. Bei Testbeginn wurden Wiederfindungsraten im Sediment von 6-200% gemessen (Tab. 2.44), wobei die Messung der höchsten Testkonzentration mit einer Wiederfindungsrate von 6% bei Testbeginn einem Fehler bei der Beprobung oder Messung zugeschrieben werden muss, da bei Testende eine ca. 10-fach höhere Konzentration der Testsubstanz im Sediment gemessen wurde. Auch die Ergebnisse der Messungen im überstehenden Wasser und im Porenwasser waren unregelmäßig (s. Tab. 8.47 im Anhang). Bei Testende lag der Bereich der Wiederfindungsraten enger zwischen 50 und 100% der nominalen Testkonzentrationen. Die berechneten Effektkonzentrationen wurden nicht mit den analytisch gemessenen Konzentrationen korrigiert.

Tab. 2.44: Wiederfindungsraten von EE2 im Sediment während des Sediment-Toxizitätstests mit *Lumbriculus variegatus*.

Probenahme- zeitpunkt [d]	Nominale Testkonzentration [mg/kg Sediment TG]	Gemessene Konzentration [mg/kg Sediment TG]	Wiederfindungs- rate [%]
0	0	n.a.	-
0	1	2	200
0	10	9	90
0	100	6	6
28	0	0	-
28	1	1	100
28	10	5	50
28	100	57	57

Bestimmungsgrenze (BG): 0,5 µg/kg TG

Auswertung des Sediment-Toxizitätstests mit AHTN

In der Lösungsmittelkontrolle war im Vergleich zur Kontrolle eindeutig ein verringertes Wachstum bezüglich der Anzahl der Würmer pro Replikat, aber auch bezüglich der Gesamtbiomasse pro Replikat zu erkennen (Tab. 2.43, Abb. 2.17). Aus diesem Grund sollte eine statistische Auswertung gegen die Lösungsmittelkontrollen erfolgen, um einen eventuell vorhandenen Effekt bedingt durch das Lösungsmittel zu berücksichtigen. Wie zuvor im Test mit EE2 zeigte sich allerdings in den niedrigen Testkonzentrationen ein größeres Wachstum als in der Lösungsmittelkontrolle, welches in der zweitniedrigsten Konzentration bei 12,5 mg/kg die gleiche Anzahl Würmer pro Replikat und sogar eine größere Gesamtbiomasse pro Replikat erreichte als in der Kontrolle (Tab. 2.43). Aus diesem Grund wurde angenommen, dass sich eventuell vorhandene Lösungsmittelrückstände in den Lösungsmittelkontrollen nicht negativ auf den Testorganismus auswirkten, ein durch die Testsubstanz bedingter hormetischer Effekt kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurde entschieden, die Kontrollen und

Lösungsmittelkontrollen wie bei der Auswertung des Tests mit EE2 für die statistischen Berechnungen zu vereinen.

Zunächst wurde die Varianzhomogenität mit dem Cochran's-Test und dem Bartlett-Box-Test überprüft. Der Cochran's-Test resultierte bei allen ausgewerteten Parametern in einer homogenen Gleichverteilung der Varianzen (Tab. 8.49 im Anhang). Eine Ausnahme ergab der Bartlett-Box-Test bei dem Parameter „Anzahl Würmer pro Replikat“, allerdings ist bei der geringen Anzahl von Replikaten der Cochran's-Test aussagekräftiger. Zur NOEC- und LOEC-Bestimmung wurde daraufhin mit jedem Parameter ein Mehrfachvergleich der vereinten Kontrollen mit den Testkonzentrationen nach Dunnett durchgeführt, der einheitlich in signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zu den vereinten Kontrollen in der höchsten Testkonzentration bei 100 mg/kg resultierte (Tab. 2.43, Abb. 2.17, Tab. 8.50 im Anhang).

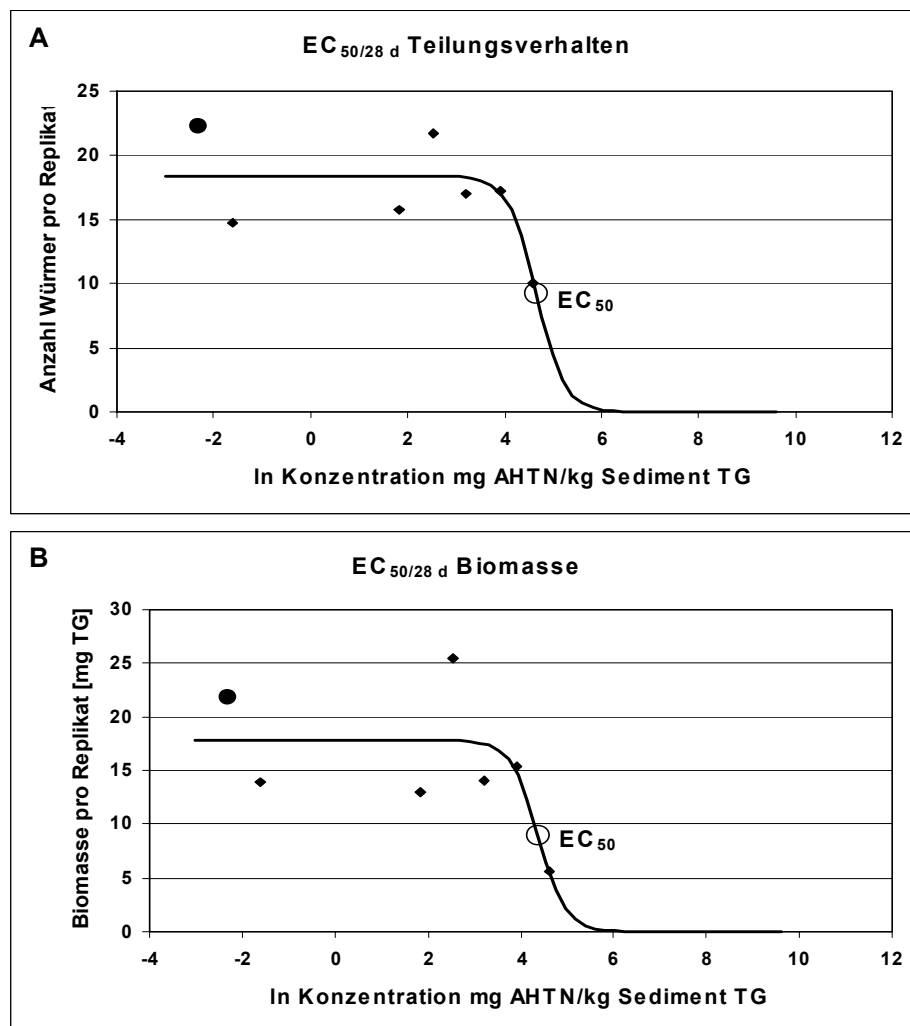


Abb. 2.19: Sediment-Toxizitätstest mit AHTN: Graphische Darstellung der Regressionsberechnung zur Ermittlung der mittleren Effektkonzentrationen EC₅₀ bezüglich des Teilungsverhaltens (A) und der Biomasse (B). Der schwarze Punkt (●) entspricht der Kontrolle und der auf der Abszisse darauf folgende Messpunkt der Lösungsmittelkontrolle, die zwecks der logarithmischen Auftragung auf 0,1 bzw. 0,2 mg/kg TG festgelegt wurden.

Die mittleren Effektkonzentrationen EC_{50} wurde mittels logistischer Regressionsberechnung für das Teilungsverhalten und den Parameter „Biomasse pro Replikat“ berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 2.19 A, B). Die mittleren Effektkonzentrationen waren $EC_{50/28 \text{ d Teilungsverhalten}} = 105 \text{ mg/kg TG}$ und $EC_{50/28 \text{ d Biomasse}} = 80 \text{ mg/kg TG}$.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Sediment-Toxizitätstests mit EE2 und AHTN

Die in den Sediment-Toxizitätsstudien ermittelten Effektkonzentrationen von 17 α -Ethinylöstradiol (EE2) und Tonalid (AHTN) sind zusammenfassend in Tab. 2.45 dargestellt.

Tab. 2.45: Effektkonzentration auf *Lumbriculus variegatus* in den Sediment-Toxizitätstests mit EE2 und AHTN nach 28 d Expositionszeit.

Endpunkt	Effektkonzentration [mg/kg TG Sediment]	
	EE2	AHTN
$EC_{50/28 \text{ d Teilungsverhalten}}$	90	105
$EC_{50/28 \text{ d Biomasse}}$	110	80
LOEC Teilungsverhalten	100	100
NOEC Teilungsverhalten	31,6	50

2.2.4 Resultate der Sediment-Bioakkumulationsstudie

Reproduktion und Wachstum von L. variegatus

Die Anzahl der bei Testbeginn eingesetzten Würmer (10 Tiere pro Replikat) nahm nach 35 Tagen Exposition in den Kontrollen (C0) auf durchschnittlich 23,5 und in den Replikaten mit kontaminierten Sediment (C1) auf durchschnittlich 22,4 zu (Tab. 2.46). Die Gesamtbiomasse der Würmer in den kleinen Testgefäßen (100 mL) betrug nach 35 Tagen Exposition sowohl in den Kontrollen, als auch in den kontaminierten Testgefäßen ca. 130 mg FG. Die Gesamtbiomasse der Würmer, gemessen in den 1 L-Testgefäßen, erhöhte sich von zu Beginn 1 g FG auf durchschnittlich 1,3 g FG, ebenfalls ohne signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und den der Substanz exponierten Tieren. Daraus lässt sich schließen, dass die Exposition der Würmer gegenüber EE2 bei 300 ng/g Sediment FG keine Auswirkungen auf die Reproduktion und das Wachstum der Testorganismen während des Versuchszeitraumes hatte.

Tab. 2.46: Anzahl Würmer und Gesamtbiomasse pro Replikat nach 35 Tagen Expositionsdauer in Kontrollen (C0) und kontaminierten Testgefäßen (C1).

Konzentrationscode	Anzahl Würmer pro Replikat ¹	Gesamtbiomasse pro Replikat [mg FG] ¹	Gesamtbiomasse pro Replikat [g FG] ²
C0	23,5 \pm 4,2 (n = 4)	133 \pm 12 (n = 4)	1,29 \pm 0,12 (n = 4)
C1	22,4 \pm 5,8 (n = 24)	126 \pm 27 (n = 4)	1,33 \pm 0,13 (n = 4)

¹: bestimmt in 100 mL-Testgefäßen für die Akkumulationskinetik;

²: bestimmt in 1 L-Testgefäßen für dünnschichtchromatische Analysen

Trockengewicht, Lipidgehalt, Sediment TOC

Das Wurm-trockengewicht wurde in Proben aus den Kontrollen auf 19,2% des Wurmfrischgewichts bestimmt (Tab. 2.47). Der Lipidgehalt der Würmer wurde in Teilproben auf 8% ihres Trockengewichts bestimmt. Der organische C-Gehalt des Sediments (TOC) wurde in den Kontrollen auf 2,4% des Sedimenttrockengewichts bestimmt.

Tab. 2.47: Trockengewicht und Lipidgehalt der Würmer und organischer C-Gehalt des Sediments (TOC) in den Kontrollen.

Trockengewicht der Würmer [% FG]	Lipidgehalt der Würmer [% TG]	Sediment-TOC [% TG]
19,2 ± 1,5 (n = 4)	8,0 ± 0,4 (n = 4)	2,4 ± 0,1 (n = 5)

Akkumulation von EE2 in L. variegatus

Die während der Aufnahmephase gemessenen Akkumulationsfaktoren zeigten eine konstante, nahezu lineare Anreicherung von Radioaktivität in den Würmern (Abb. 2.20-A). Nach 28 Tagen Exposition ergab sich ein Akkumulationsfaktor, normiert auf den Lipidgehalt der Würmer und den TOC des Sediments ($AF_{\text{lipid/OC}}$), von 58. Da zwischen den Messpunkten bei Tag 21 und Tag 28 eine leichte Abflachung der Kurve zu erkennen war, wurde die Expositionsphase um eine Woche verlängert, um eventuell ein Aufnahmegleichgewicht (*steady state*) in den Würmern zu erreichen. Nach 35 Tagen Exposition zeigte sich jedoch weiterhin eine konstante Anreicherung der Radioaktivität in den Würmern. Die Akkumulationsphase wurde nach 35 d beendet und die Würmer in EE2-freies Sediment überführt. Der auf die Gesamtradioaktivität bezogene gemessene Akkumulationsfaktor ($AF_{\text{lipid/OC}}$) betrug nach 35-tägiger Exposition 75.

Die gemessenen Akkumulationsfaktoren wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse extrapoliert, wobei ein hypothetischer Biota-Sediment-Akkumulationsfaktor (BSAF) im *steady state* von ca. 191 ermittelt wurde. Der BSAF wäre theoretisch nach ca. 1 Jahr konstanter Exposition unter den Versuchsbedingungen erreicht. Der nach 35 Tagen gemessene $AF_{\text{lipid/OC}}$ von 75 entspricht ca. 40% des geschätzten BSAFs. 50% bzw. 90% des geschätzten BSAFs wären nach 50 bzw. nach 166 Tagen Exposition erreicht (Tab. 2.48, Abb. 2.20-B).

Bedingt durch die hohe Aufnahme an Radioaktivität aus dem Sediment durch die Würmer, verringerte sich die Gesamtradioaktivität im Sediment auf 68% der anfänglichen Konzentration. Trotz dieser Beobachtung wurde keine Verlangsamung der Aufnahme an Radioaktivität über den Testzeitraum festgestellt. Die gemessene Gesamtradioaktivität im überstehenden Wasser stieg nach 21 Tagen auf ca. 1% der zu Beginn in das Sediment zugegebenen Konzentration an und blieb in den darauf folgenden zwei Wochen bis Tag 35 konstant.

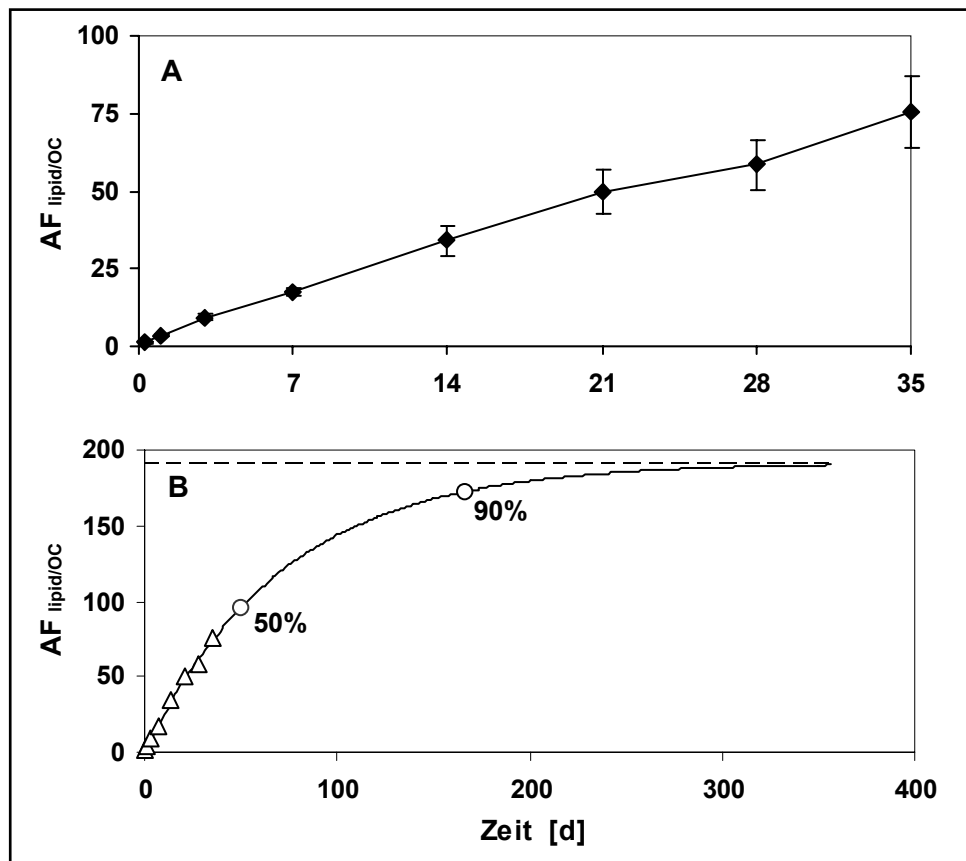


Abb. 2.20: A Während der Akkumulationsphase gemessene Akkumulationsfaktoren (AF) (Standardabweichungen, $n = 4$) und B mittels nichtlinearer Regressionsanalyse extrapolierte Akkumulationsverlauf, basierend auf den gemessenen Werten. Die Dreiecke zeigen die gemessenen Werte auf der Regressionskurve, die Kreise zeigen an, zu welchen Zeitpunkten 50%, bzw. 90% des hypothetischen BSAFs (gestrichelte Linie) erreicht sind. Alle Akkumulationsfaktoren sind auf den Lipidgehalt der Würmer und den TOC des Sediments normiert ($AF_{\text{lipid/OC}}$).

Tab. 2.48: Gemessene (AF) und mittels nichtlinearer Regressionsanalyse berechnete Akkumulationsfaktoren (B(S)AF), normiert auf Biota- und Sediment-Trockengewicht (TG) und -Frischgewicht (FG) sowie auf den Lipidgehalt der Würmer und den Sediment TOC.

	Akkumulationsparameter	Expositionszeit [d]	Akkumulationsfaktoren		
			FG/FG	TG/TG	Lipid/OC
Gemessene Werte ($n = 4$):	AF	35	90 ± 14	254 ± 39	75 ± 12
Geschätzte Werte:	50% des B(S)AF	50	115	323	96
	90% des B(S)AF	166	207	582	172
	B(S)AF	ca. 365	230 ± 60	646 ± 168	191 ± 50

Elimination von EE2 aus *L. variegatus*

Während der 10-tägigen Eliminationsphase in unkontaminiertem Sediment wurden zu fünf Zeitpunkten Proben des überstehenden Wassers, des Sediments und der Würmer entnommen und deren Gesamtradioaktivität gemessen. Abb. 2.21-A zeigt den Verlauf der Abnahme der Gesamtradioaktivität in den Würmern im Verhältnis zur Konzentration (Startwert), welche am Zeitpunkt des Transfers der Würmer am 35. Expositionstag gemessen wurde. Die Eliminationskinetik zeigte ein ähnliches Muster wie die Akkumulationskinetik. Während der ersten 7 Tage in unkontaminiertem Sediment wurde eine langsame aber konstante, nahezu lineare Abnahme der Gesamtradioaktivität auf ca. 50% des Startwertes beobachtet. Zu dem darauf folgenden Messzeitpunkt nach 10 Tagen konnte keine weitere Elimination der Gesamtradioaktivität aus den Würmern gemessen werden.

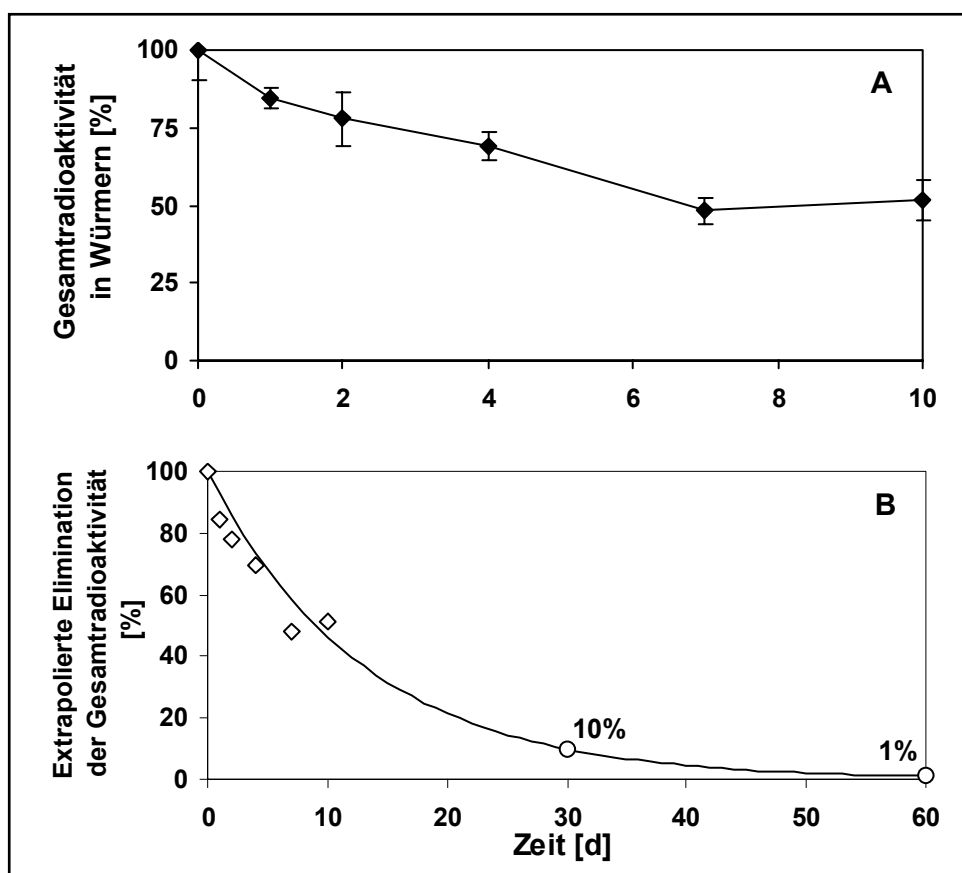


Abb. 2.21: A Während der Eliminationsphase in den Würmern gemessene Gesamtradioaktivität (Standardabweichungen, $n = 4$) im Verhältnis zum am Ende der Expositionsphase (Tag 35) gemessenen AF (Startwert) und B mittels nichtlinearer Regressionsanalyse extrapolierter Eliminationsverlauf, basierend auf den gemessenen Werten. Die Rauten zeigen die gemessenen Werte auf der Regressionskurve, die Kreise zeigen die abgeschätzten Zeitpunkte an, zu welchen 10%, bzw. 1% des Startwertes erreicht sind.

Auf Grund des gleichmäßigen und nahezu linearen Eliminationsverlaufs während der ersten sieben Tage und der anschließenden Stagnation bis zum Ende der 10-tägigen Eliminationsphase wurde die Eliminationskinetik zunächst mit dem Zwei-Kompartiment-Modell (Gleichung 2.8, Abschnitt 2.1.9) berechnet. Diese Berechnung ergab jedoch ein überwiegend gro-

ßes und ein vernachlässigbar kleines Kompartiment. Unter Anwendung des Ein-Kompartiment-Modells (Gleichung 2.5, Abschnitt 2.1.9) konnte eine Regression mit $r^2 \geq 0,919$ angepasst werden. Der mittels nichtlinearer Regressionsanalyse extrapolierte Eliminationsverlauf, basierend auf den gemessenen Konzentrationen der Gesamtradioaktivität in den Würmern während der 10-tägigen Eliminationsphase, ist in Abb. 2.21-B dargestellt. Nach dieser Abschätzung wäre nach einer 30-tägigen Eliminationsphase in undotiertem Sediment die in den Würmern enthaltene Gesamtradioaktivität auf 10% des Startwertes reduziert. Nach insgesamt 60 Tagen wäre noch 1% der zu Beginn angereicherten Gesamtradioaktivität in den Würmern vorhanden.

Dünnschichtchromatographie der Wurmextrakte

Mittels dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Wurmextrakte konnten lediglich zwei Banden mit unterschiedlichen Retentionsfaktoren festgestellt werden, welche zum einen der Ursubstanz EE2, und zum anderen dem Auftragungspunkt entsprachen. Die Entwicklung der Extrakte aller vier untersuchten Replikate ergab jeweils das gleiche Muster. In der Stammlösung, welche als Referenz für die Ursubstanz EE2 diente (Laufbahn I in Abb. 2.22 und Tab. 2.49), fanden sich ca. 77% der gesamten auf dieser Laufbahn aufgetragenen Radioaktivität auf der oberen Bande wieder, welche als EE2-Bande definiert wurde. 13% der Gesamtradioaktivität verblieben auf dem Auftragungspunkt. Die verbleibenden 10% waren auf der Laufbahn verteilt und bildeten keine definierbare Bande (Tab. 2.49). Die unbehandelten Wurmextrakte (Laufbahn II) resultierten in eine Bande mit 6% der Gesamtradioaktivität auf der Höhe der EE2-Bande, wobei durchschnittlich 92% auf dem Auftragungspunkt verblieben. Die mit β -Glucuronidase behandelten Wurmextrakte (Laufbahn III) zeigten ein ähnliches Bild, wie der EE2-Standard. Die enzymatisch behandelten Wurmextrakte zeigten eine Bande mit durchschnittlich 84% der auf der Laufbahn aufgetragenen Gesamtradioaktivität auf dem Niveau der EE2-Bande, wobei 10% der Radioaktivität auf dem Auftragungspunkt zurückblieben.

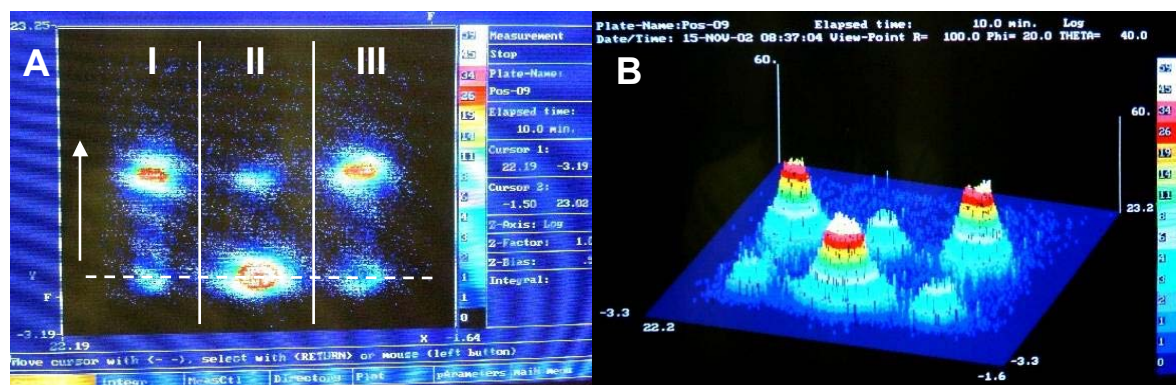


Abb. 2.22: 2-dimensionale (A) und 3-dimensionale (B) Darstellung einer entwickelten DC-Platte mittels eines digitalen radiographischen „Scans“. Die gestrichelte Linie markiert die Auftragungsebene, der Pfeil zeigt die Laufrichtung. Aufgetragen wurden ^{14}C -EE2-Standard (Laufbahn I), unbehandelter Wurmextrakt (Laufbahn II) und mit β -Glucuronidase behandelter Wurmextrakt (Laufbahn III).

Tab. 2.49: Prozentualer Anteil der Gesamtradioaktivität pro Laufbahn auf der EE2-Bande und dem Auftragungspunkt (n = 4). Untersucht wurde ^{14}C -EE2-Standard, unbehandelter Wurmextrakt und mit β -Glucuronidase behandelter Wurmextrakt.

Laufbahn: Bande	I (EE2-Standard)	II (unbehandelter Wurmextrakt)	III (Extrakt nach enzymatischer Behandlung)
EE2-Bande	76,7 \pm 8,4	5,8 \pm 0,5	83,6 \pm 5,1
Auftragungspunkt	12,7 \pm 2,4	92,4 \pm 1,0	9,9 \pm 4,8

Obwohl die Dünnschichtchromatographie ohne zusätzliche Isolation und chemischer Analyse keinen eindeutigen Beweis der Substanzidentität auf den Banden darstellt, so liefert die zuvor beschriebene Auftrennung der Steroide EE2, Mestranol, Norethynodrel und Norethisteron (Tab. 2.12, Abschnitt 2.1.9) und die Verwendung der ‚Radiotracer‘-Technik einen nahezu gesicherten Nachweis, dass die radioaktive Bande der Wurmextrakte mit demselben Retentionsfaktor wie der ^{14}C -EE2-Standard auch tatsächlich aus ^{14}C -EE2 besteht.

2.3 Diskussion der durchgeführten ökotoxikologischen Studien

2.3.1 Akuttests

Algenwachstum-inhibitionstest

Der Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX zeigte eine sehr steile Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der niedrigsten eingesetzten (2,5 mg/L) und der darüber liegenden Testkonzentration (5 mg/L). Auf Grund dieser steilen Dosis-Wirkungsbeziehung ist die mittels Probit-Analyse hergeleitete mittlere Effektkonzentration mit einer erhöhten Unsicherheit belastet. Da der Abstand zwischen den getesteten Konzentrationen mit dem Faktor 2 allerdings sehr niedrig gewählt wurde, ist das Ergebnis für die Verwendung in einer Umweltrisikoprüfung akzeptabel.

Akute Daphnien-Toxizität

Der Daphnien-Toxizitätstest mit SMX resultierte in eine $\text{EC}_{50/48\text{ h}}$ von 125 mg/L. Bei der zweithöchsten Testkonzentration von 80 mg/L wurde keine Immobilisierung von Daphnien beobachtet. Das Antibiotikum kann somit entsprechend der EU-Klassifizierung als nicht akut toxisch für Daphnien bezeichnet werden. Diese Klassifizierung orientiert sich an den Kriterien für die Standardsätze „Besondere Gefahren“ (R-Sätze), die Substanzen mit einer EC/LC_{50} von 10-100 mg/L als „schädlich für Wasserorganismen“ und darüber hinaus als „nicht schädlich“ beurteilt (EC, 2001).

Akute Fisch-Toxizität

Im Fisch-Toxizitätstest mit SMX wurden keine Effekte auf *D. rerio* festgestellt und die LC_{50} auf > 100 mg/L bestimmt. Auf Grund des spezifischen Wirkungsmechanismus des Antibiotikums gegenüber Mikroorganismen (vgl. Abschnitt 8.1.2 im Anhang) und der relativ guten Verträglichkeit nach der Anwendung beim Menschen, war dieses Ergebnis bei Vertebraten nicht unerwartet.

Der Fisch-Toxizitätstest mit CBZ resultierte in eine LC_{50} von 35,4 mg/L. Dieses Ergebnis widerspricht der generellen Einteilung von Antiepileptika als pharmazeutische Wirkstoffgruppe in den Bereich „nicht toxisch“ ($EC/LC_{50} > 100$ mg/L; vgl. Abschnitt 0) für Fische und Crustaceen, welche von Derksen (2000, zitiert in CSTEE, 2001) für 7 Hauptgruppen der Humanpharmaka erstellt wurde. In einem Akuttest mit *Daphnia* sp. (Pfluger et al., 2000), erwies sich die Wirksamkeit von CBZ ebenso stärker als von Derksen erwartet mit einer $EC_{50/48\text{ h}} = 67,5$ mg/L.

Fischembryo-Toxizität

Die Ergebnisse des Fischembryo-Toxizitätstest mit SMX entsprachen mit einer $LC_{50/48\text{ h}}$ von > 100 mg/L den Ergebnissen aus der Fisch-Akutstudie. Sulfamethoxazol wird somit als nicht toxisch für Fische klassifiziert (EC, 2001).

Im Fischembryo-Toxizitätstest mit CBZ zeigten die Embryonen von *D. rerio* nach 48 h Exposition zunächst eine geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Antiepileptikum als die adulten Tiere. Nach 96 h zeigte sich jedoch eine Herabsetzung der Herzschlagfrequenz und eine Verzögerung oder Verhinderung des Schlüpfens. Die anfänglich geringere Empfindlichkeit der Embryonen könnte durch die Schutzfunktion des Chorions verursacht sein. Möglicherweise wird mit fortschreitender Reifung des Embryos das Chorion für die Testsubstanz durchlässiger und spätestens zum Zeitpunkt des Schlüpfens wird die schützende Funktion des Chorions gänzlich aufgehoben und die Larven der Substanz unmittelbar ausgesetzt. Dabei weisen die frisch geschlüpften Larven möglicherweise eine höhere Empfindlichkeit als die adulten Fische auf, da sie sich noch in der Wachstums- und Entwicklungsphase befinden, während der ein Eingriff in physiologische Vorgänge zu massiven Entwicklungsstörungen führen kann. Dies hatte zur Folge, dass die EC_{50} für den Parameter Schlupfrate nach 96 h Exposition (13,3 mg/L) niedriger lag, als die $LC_{50/96\text{ h}}$ im Akuttest mit adulten Tieren (35 mg/L). Die ökologische Relevanz des Parameters Schlupfrate nach einer bestimmten Expositionszeit kann hier allerdings nicht eindeutig spezifiziert werden, da es theoretisch möglich ist, dass der Schlupf lediglich verzögert wurde und sonst keinerlei Beeinträchtigung auf den Embryo mit sich brachte. Um den Parameter Schlupfrate in seiner Relevanz einem letalen Parameter gleichzusetzen, hätte der Test soweit fortgesetzt werden müssen, bis alle Larven entweder geschlüpft und lebendig, oder aber nicht geschlüpft, bzw. nach dem Schlüpfen sofort abgestorben wären. Deshalb sollte für die Verwendung in einer Umweltrisikobewertung als letale Wirkkonzentration die $LC_{50/96\text{ h}}$ von 35 mg/L aus dem akuten Fisch-Toxizitätstest herangezogen werden.

2.3.2 Daphnien-Reproduktionstest

Die Daphnien-Reproduktionsstudie mit CBZ zeigte bei einer chronischen Exposition über ca. zwei Generationszeiten deutliche Effekte auf die Reproduktionsleistung und auf das Wachstum der Testorganismen ($\text{NOEC} = 0,4 \text{ mg/L}$). Pfluger et al. (2000) bestimmten in einem akuten Daphnien-Toxizitätstest eine $\text{EC}_{50/48 \text{ h}}$ von $67,5 \text{ mg/L}$. Dieses Ergebnis stimmt mit der hier beobachteten Mortalität mit einer mittleren Effektkonzentration von $\text{EC}_{50/21 \text{ d}} = 9,4 \text{ mg/L}$ gut überein. Es verdeutlicht allerdings auch die bei weitem größere Empfindlichkeit der subletalen und populationsökologisch relevanten Parameter Reproduktionsleistung und Wachstum der Daphnien bei einem chronischen und somit realitätsnäheren Expositionsszenarium.

Für die Herleitung der PNEC bei einer Umweltrisikoprüfung werden Bewertungsfaktoren auf gemessene Effektkonzentrationen angewendet (vgl. Abschnitt 1.4.1). Das Schema für die Festlegung der Größe unterschiedlicher Bewertungsfaktoren beruht auf dem im TGD (EC, 2003) verwendeten System. Dieses System berücksichtigt bei der Extrapolation von im Labor für einzelne Arten erstellten Effektkonzentrationen auf das Ökosystem jeweils den Faktor 10 für verschiedene Unsicherheiten:

- Intra- und Inter-Speziesvariationen (biologische Varianz),
- Extrapolation von Kurzzeit- auf Langzeit-Effektdaten,
- Unterschiede zwischen Empfindlichkeiten einer Laborspezies und derjenigen von natürlichen Lebensgemeinschaften, wo synergistische und antagonistische Effekte anderer Substanzen eine Rolle spielen können (Extrapolation auf die natürliche Situation).

Somit wird für die Extrapolation von im Labor erstellten Kurzzeit-Effektdaten auf realistische Umweltbedingungen ein Bewertungsfaktor von 1000 ($10 \times 10 \times 10$) vorgeschlagen, der den Faktor 10 für die Extrapolation von Kurzzeit- auf Langzeit-Effektdaten enthält. Der Faktor zwischen der im akuten Daphnien-Toxizitätstest ermittelten $\text{EC}_{50} = 67,5 \text{ mg/L}$ (Pfluger et al., 2000) und der in dieser Studie ermittelten chronischen $\text{NOEC} = 0,4 \text{ mg/L}$ beträgt ca. 170. Dieser Unterschied veranschaulicht die Problematik bei der Beurteilung von Kurzzeit-Effektdaten von Pharmaka. Bei der Verwendung der herkömmlichen Beurteilungs- und Extrapolationsprinzipien können daher potenziell in der Umwelt auftretende Effekte leicht unterschätzt werden oder unerkannt bleiben.

2.3.3 Sediment-Toxizitätsstudien

In der Sediment-Toxizitätsstudie mit EE2 wurde eine Dosis-Wirkungsbeziehung mit Effekten auf die Reproduktion und Biomasseproduktion im oberen getesteten Konzentrationsbereich beobachtet. Eine Ausnahme der regelmäßigen Dosis-Wirkungsbeziehung stellt die geringe Gesamtbiomasse pro Replikat in der Lösungsmittelkontrolle dar, die anderen erfassten biologischen Parameter zeigten jedoch keine Unterschiede zwischen der Lösungsmittelkontrolle und der Kontrolle. Eine mögliche Erklärung der verringerten Biomasse der Würmer der Lösungsmittelkontrolle könnte folgende sein: Beim Auflösen der Testgefäße und Auszählen der

Würmer bei Testende wurden die 4 Kontrollen und 4 Lösungsmittelkontrollen zeitgleich von der Belüftung entfernt und der Reihenfolge nach von Replikat 1 bis 4 der Kontrollen und anschließend Replikat 1 bis 4 der Lösungsmittelkontrollen behandelt bzw. ausgezählt. Alle weiteren Konzentrationen wurden im Rhythmus zu jeweils 4 Gefäßen von der Belüftung entfernt und ausgezählt. Bei Tubificiden, einer anderen Familie der Oligochaeten, wurde der Mechanismus der Darmatmung beschrieben, mit dem die Würmer bei akutem Sauerstoffdefizit die Sauerstoffzufuhr erhöhen können (Alsterberg, 1922). Dabei wird der Darm entleert, um zusätzlich über die Darmwand Sauerstoff aus dem Medium aufnehmen zu können. Als die Auszählung der Würmer begonnen wurde, waren die Replikate der Lösungsmittelkontrolle wie oben beschrieben länger als alle anderen Replikate von der Belüftung getrennt. Dadurch wurde möglicherweise der Sauerstoffgehalt im Wasser reduziert und die Würmer zur Darmentleerung veranlasst. Da der Darminhalt im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht eines Wurmes auf Grund des Quarzsandanteils relativ schwer ist, könnte dieses Verhalten eine signifikante Verringerung des Körpergewichtes zufolge haben.

Die beobachteten Effekte auf das Reproduktionsverhalten der Würmer können auf Grund der hohen eingesetzten Testkonzentration von bis zu 100 mg/kg TG nicht auf die endokrinen Eigenschaften des synthetischen Steroids EE2 zurückgeführt werden. Hormonelle Wirkungsweisen setzen normalerweise bei weit geringeren Konzentrationen ein. In der hier gemessenen wirksamen Konzentration ist eine durch einen anderen physiologischen Mechanismus vermittelte toxische Wirkung anzunehmen. Dabei ist auffällig, dass EE2 in dieser hohen Konzentration keine Mortalität bewirkt, sondern sich ausschließlich auf das Reproduktions- bzw. Teilungsverhalten der Würmer auswirkt. Die Organismen scheinen äußerlich nicht durch die Testsubstanz beeinträchtigt worden zu sein, sie wirkten beim Auswerten der Testgefäße bei Testende unbeeinträchtigt und agil und besaßen ein hohes Individualgewicht. Ob sich der hier beobachtete Effekt in der höchsten Testkonzentration von EE2 auf Populationsebene wiederfindet, ist mit der durchgeführten Studie nicht zu belegen. Es ist möglich, dass die Teilungsrate, also die asexuelle Fortpflanzung der Würmer zwar gehemmt ist, aber dadurch die sexuelle Fortpflanzung und Bildung von Eiern und Kokons gleich bleibt oder sogar gefördert wird. Dies ist auf Grund der begrenzten Dauer des Tests von 28 Tagen im Rahmen dieser Laborstudie nicht überprüfbar, da es generell sehr schwer ist, *L. variegatus* im Labor zur geschlechtlichen Fortpflanzung zu bewegen (Drewes, 1996).

Im Sediment-Toxizitätstest mit AHTN haben sich die Würmer in den Testgefäßen der höchsten Testkonzentration (100 mg/kg) im Testverlauf nicht oder nur sehr begrenzt reproduziert. Diesem Ergebnis entspricht die signifikant niedrigere Biomasse pro Replikat. Es ist allerdings auffällig, dass die individuelle Wurmbiomasse ebenso signifikant niedriger ist als die in den Kontrollen. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Würmer ohne sich zu teilen relativ zu den Kontrollen an individueller Biomasse zunehmen, wie dies auch im Test mit EE2 in der höchsten Testkonzentration beobachtet wurde. Trotzdem haben die vorhandenen adulten Würmer kaum an Biomasse zugenommen, was darauf schließen lässt, dass die Nahrungsaufnahme stark reduziert war oder nicht stattgefunden hat. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt,

dass auf den Sedimentoberflächen der höchsten Testkonzentration während des Tests und bei Testende kaum Exkremente der Würmer (Kotpellets) zu sehen waren.

Außerdem wurde bei Expositionsbeginn ein Vermeiden des Eingrabens der Würmer in das Sediment beobachtet, bei dem eindeutig eine Dosis-Wirkungsbeziehung zu erkennen war. In den Kontrollen und in den Testkonzentrationen bis 12,5 mg/kg wurde dieses Verhalten nicht beobachtet und die Würmer waren bereits alle nach 16 h in das Sediment eingegraben. Je höher die Testkonzentration, desto häufiger trat dieses Verhalten auf und desto länger dauerte es, bis die Würmer das Sediment akzeptierten und sich darin vergruben. In einem Replikat der höchsten Testkonzentration waren erst am 9. Expositionstag alle Würmer im Sediment eingegraben. Das Vermeiden des Eingrabens kann als eindeutiges Indiz einer Auswirkung der Testsubstanz AHTN auf das Verhalten der Würmer gewertet werden.

2.3.4 Sediment-Bioakkumulationsstudie

Die in der Sediment-Bioakkumulationsstudie mit ^{14}C -EE2 gemessene Akkumulation von Gesamtradioaktivität in *L. variegatus* mit einem Akkumulationsfaktor ($\text{AF}_{\text{lipid/OC 35 d}}$) von 75 war, verglichen mit anderen Bioakkumulationsstudien, die mit lipophilen Substanzen und *L. variegatus* durchgeführt wurden, unerwartet hoch. Dieser hohe gemessene Akkumulationsfaktor ist umso erstaunlicher, da nach 35-tägiger Exposition der Würmer gegenüber kontaminierten Sediments keine Einstellung eines Sättigungs-Gleichgewichts zwischen Sediment und Würmer (*steady state*) zu erkennen war.

Tab. 2.50: Aus der Literatur zusammengetragene Biota-Sediment-Akkumulationsfaktoren (BSAF) für lipophile Substanzen gemessen in *Lumbriculus variegatus* im Vergleich zu dem nach 35 Tagen gemessenen AF der hier vorgestellten Studie.

Substanz	log K_{ow}	max. Konzentration im Sediment [ng/g TG]	gemessener BSAF	Referenz
Polychlorierte Biphenyle (PCBs)	k. A.	15.000	1,7	Pickard et al. (2001)
Fluoranthren	5,2	355.000	1,9 (= $\text{BAF}_{\text{FG/TG}}$)	Landrum et al. (2002)
Polychlorierte Alkane	6,2-7,4	442	10	Fisk et al. (1998)
Polyzykl. aromatische Kohlenwasserstoffe	3,4-6,4	k.A.	27	Brunson et al. (1998)
EE2 (konjugiert ^a)	4,2	556	75 (= $\text{AF}_{\text{lipid/OC 35 d}}$)	vorliegende Studie

k. A. = keine Angabe; ^a: EE2 lag in den Würmern größtenteils in konjugierter Form vor

Tab. 2.50 veranschaulicht den hohen gemessenen AF im Vergleich mit Ergebnissen ähnlicher Bioakkumulationsstudien mit *L. variegatus* und vergleichbar lipophilen Substanzen. Die hier aufgeführten Biota-Sediment-Akkumulationsfaktoren (BSAFs) wurden alle bis auf den AF der eigenen durchgeführten Studie im *steady state* gemessen. Dabei wird deutlich, dass sich

ein *steady state* gewöhnlich im Bereich des unteren Drittels des mit EE2 nach 35-tägiger Exposition gemessenen AFs einstellt. Allerdings muss hierbei angemerkt werden, dass das im Wurm angereicherte EE2 größtenteils in konjugierter Form vorlag, was sich durch die Dünnschichtchromatographie der Wurmextrakte herausstellte. Somit ist der Vergleich des gemessenen Akkumulationsfaktors für EE2 mit den Bioakkumulationsfaktoren anderer lipophiler Substanzen nur bedingt zulässig (Tab. 2.50), da diese nicht konjugiert werden können.

Bedingt durch die hohe Anreicherung an Radioaktivität in den Würmern wurde während der Eliminationsphase ein leichter, aber konstanter Anstieg an Radioaktivität im zunächst unkontaminierten Sediment gemessen. Bis zum Ende der Eliminationsphase stieg die Gesamtradioaktivität im Sediment auf 1.600 dpm/g FG Sediment an. Da zu diesem Zeitpunkt die in den Würmern gemessene Gesamtradioaktivität ca. 2.000-mal höher war (ca. $3,2 \times 10^6$ dpm/g) als die im Sediment gemessene Radioaktivität, wird ein relevanter Einfluss der im Sediment vorhandenen Gesamtradioaktivität auf den Eliminationsprozess ausgeschlossen.

Die mittels nichtlinearer Regressionsanalyse durchgeführten Extrapolationen von gemessenen Daten beinhalten einen hohen Unsicherheitsgrad, da nur ein geringer Bereich der Regressionskurven durch gemessene Daten unterstützt wird. Die gemessenen Akkumulationsfaktoren der 35-tägigen Aufnahmephase decken lediglich die ersten 10% des extrapolierten Regressionsverlaufs über ca. 1 Jahr ab. Beim Regressionsverlauf der Eliminationsphase entspricht der durch gemessene Daten abgedeckte Bereich ca. 17% der extrapolierten Regressionskurve. Eine geringfügige Änderung der Datengrundlage könnte somit zu einer maßgeblichen Verschiebung des extrapolierten Bereichs der Regressionen führen. Deshalb werden für weitere Betrachtungen lediglich die maximal gemessenen und somit abgesicherten Akkumulationsfaktoren am Ende der Aufnahmephase verwendet (vgl. Kap. 4).

Individuen der Spezies *L. variegatus* erreichen in freier Natur oder auch in Laborhaltung sehr wahrscheinlich nicht ein Alter von einem Jahr. Durch die unter Laborbedingung bevorzugte Reproduktionsweise durch Autotomie (Drewes, 1996; vgl. Abschnitt 2.1.8) sind die Würmer jedoch theoretisch, ähnlich den Mikroorganismen, potenziell unsterblich. Somit wird in den Würmern akkumulierte Substanz jeweils an nachfolgende Generationen weiter gegeben.

In der durchgeführten Bioakkumulationsstudie wurden die Würmer zu allen Zeitpunkten samt ihren Darminhalts, d.h. zusammen mit aufgenommenen, im Darm befindlichen kontaminierten Sediment, beprobt und analysiert. Es wird angenommen, dass im Allgemeinen während der ersten 6 Stunden der Eliminationsphase der größte Teil des Darminhalts ausgeschieden und durch unkontaminiertes Sediment ersetzt wird (Mount et al., 1999). Nach den ersten 24 h der Eliminationsphase wurde eine Abnahme der in den Würmern enthaltenen Gesamtradioaktivität von 15% gemessen. Dies verdeutlicht, dass der im Darminhalt befindliche Anteil an der im Wurm akkumulierten Gesamtradioaktivität zum Zeitpunkt des Transfers der Würmer von kontaminiertem in unkontaminiertes Sediment verhältnismäßig klein war.

Die stetige, lineare und in hohem Maße stattfindende Akkumulation und ebensolche gleichmäßige Elimination von Radioaktivität deuten darauf hin, dass aktive Aufnahme- bzw. Ausscheidungsprozesse eine wesentliche Rolle in dieser Kinetik spielen. Im Folgenden soll versucht werden, eine hypothetische Erklärung der ungewöhnlich großen Anreicherung und langsamen Ausscheidung zu formulieren. Mittels Dünnschichtchromatographie unbehandelter und enzymatisch behandelter Wurmextrakte konnte gezeigt werden, dass das akkumulierte ^{14}C -EE2 im Wurm fast ausschließlich in einer durch β -Glucuronidase spaltbaren Form vorlag. Auf Grund der spezifischen Aktivität des verwendeten Enzyms muss angenommen werden, dass es sich dabei hauptsächlich um EE2-Konjugate in Form von Glucuroniden und Sulfaten handelte. Im Menschen wird 17α -Ethinylöstradiol zum einem Teil nach Hydroxylierung, zu einem anderen Teil direkt zu Sulfat- und Glucuronidkonjugaten biotransformiert (Guengerich, 1990; Williams & Stancel, 1996), um in dieser gut wasserlöslichen Form über die Nieren mit dem Harn ausgeschieden zu werden. *L. variegatus* ist offenbar nicht in der Lage, oder zumindest scheint es nicht der dominierende Stoffwechselweg zu sein, solche EE2-Konjugate auszuschcheiden. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist die Absonderung von EE2-Transformationsprodukten in das sogenannte Chloragog-Gewebe, bzw. den Chloragozyten. Chloragozyten sind bei den Oligochaeten vorkommende spezialisierte peritoneale Zellen der Darmwand und der dorsalen Blutgefäße (Stephenson, 1972; Dhainhaut & Scaps, 2001). Ähnlich der Leber bei Vertebraten spielen sie eine wichtige Rolle bei metabolischen Aktivitäten und bei der Exkretion und der Speicherung von Glykogen und Lipiden (Dhainhaut & Scaps, 2001). Bei terrestrischen Oligochaeten konnte gezeigt werden, dass Chloragozyten eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von Cadmium (Morgan & Morgan, 1998) und organischen Xenobiotika (Prento, 1994) aus anderen Bereichen des Körpers spielen und dadurch potenzielle Giftstoffe inaktiviert werden. Prento (1994) zeigte weiter, dass selbst gut wasserlösliche natürliche und synthetische Farbstoffe auf Grund ihrer amphiphilen Eigenschaften von terrestrischen Oligochaeten in den Chloragozyten akkumuliert werden können. Der Autor nahm an, dass die Ausscheidung der mit Farbstoffen gesättigten Chloragozyten über dorsale Poren ein möglicher Entgiftungsweg bei Oligochaeten sei. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit des Speicherstoffs Glykogen (ein Polysaccharid aus D-Glucose-Einheiten) mit dem Substituenten der EE2-Glucuronide (D-Glucuronsäure), wäre ein aktiver Transport der Konjugate in die Chloragozyten denkbar – sei es als Absonderungs- und Entgiftungsmechanismus des EE2 oder als „versehentlicher“ Speichervorgang. Da die erwähnten Coelom- oder Rückenporen allerdings nur bei landbewohnenden, nicht aber bei den im Süßwasser lebenden Oligochaeten vorkommen (Peters, 1986), könnte bei *L. variegatus* dadurch eine erhöhte Anreicherung und nur langsame Ausscheidung von EE2-Konjugaten stattfinden. Die Ursache der hohen Anreicherung, der ihr zu Grunde liegende Mechanismus und der tatsächliche Speicherort von ^{14}C -EE2 und dessen Transformationsprodukten bleiben hier allerdings ungeklärt und bedürfen weiterer Forschungsarbeiten.

Die in dieser Studie gemessene hohe Akkumulation von EE2 und dessen Transformationsprodukten in *L. variegatus* gibt Anlass zu Besorgnis. Die Dünnschichtchromatographie der Wurmextrakte zeigte, dass das von den Würmern aufgenommene ^{14}C -EE2 nicht durch metabolische Prozesse abgebaut, sondern fast ausschließlich in einer enzymatisch spaltbaren und

somit wieder in die Ursubstanz rückführbaren Form angereichert wurde. Somit bleibt das EE2 zu einem hohen Anteil für Prädatoren von *L. variegatus* bioverfügbar.

Schlussfolgerungen

Diese Studie hat am Beispiel des Steroidhormons 17 α -Ethinylöstradiol gezeigt, dass Bioakkumulation sedimentgebundener Pharmazeutika mit bestimmten Eigenschaften in benthischen Organismen möglich ist, und somit das Potenzial besteht, akkumulierte Substanzen zu höheren trophischen Ebenen zu transferieren. Eine Aufkonzentrierung von Substanzen über verschiedene trophische Ebenen (Biomagnifikation) kann, als zusätzliche Expositionsquelle zur Biokonzentration, zu erhöhten Körperkonzentrationen bei Prädatoren führen, sodass daraus toxische Wirkungen auf diese Organismen resultieren (*secondary poisoning*). In Kapitel 4 wird das Potenzial von EE2 *secondary poisoning* zu verursachen näher erläutert und diskutiert. Die alleinige Untersuchung der Biokonzentration (Anreicherung von Chemikalien in pelagischen Organismen, meist Fischen) ist somit nicht ausreichend, um das Potenzial der Gefährdung aquatischer Organismen durch lipophile Pharmazeutika zu beurteilen.

Eignung von L. variegatus als Testspezies

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass *L. variegatus* möglicherweise zur Absonderung von bestimmten organischen Schadstoffen in das Chloragog-Gewebe befähigt sei, wodurch die interne Bioverfügbarkeit dieser Schadstoffe herabgesetzt wäre. Dies würde bedeuten, dass die akute und chronische Toxizität solcher Substanzen gegenüber *L. variegatus* reduziert oder vermieden werden könnte. Würde sich diese besondere Fähigkeit des Oligochaeten bestätigen und für mehrere organische Schadstoffe zutreffen, so könnte die Eignung von *L. variegatus* als alleinige Testspezies in Sediment-Toxizitätstests in Frage gestellt werden. Die Verwendung mehrerer Arten bei der Prüfung der Toxizität gegenüber sedimentbewohnenden Organismen wäre dann zu empfehlen, z.B. *Chironomus* sp. (Riedhammer & Schwarz-Schulz, 2001; EC, 2003). Andererseits würden der hypothetische Absonderungsmechanismus und die daraus resultierende Toleranz gegenüber Schadstoffen *L. variegatus* zu einem besonders gut geeigneten Testorganismus für Sediment-Bioakkumulationsstudien ausweisen. Ingersoll & McDonald (2001) führten die im Allgemeinen geringe Empfindlichkeit von *L. variegatus* gegenüber sedimentassoziierte Schadstoffe als Kriterium für die Auswahl des Oligochaeten für Bioakkumulationsstudien an. Durch diese Eigenschaft von *L. variegatus* kann Bioakkumulation in einem „worst-case“-Szenarium untersucht werden, wodurch in einer Umweltrisikobewertung und in der Beurteilung von *secondary poisoning* in Nahrungsnetzen eine größere Sicherheit erreicht wird.

2.4 Zusammenfassung der empfindlichsten Effektdaten

Zur Herleitung von in der Umweltrisikoprüfung verwendbaren PNECs der hier untersuchten Substanzen werden die Effektdaten der empfindlichsten Organismen herangezogen. Diese Effektdaten wurden aus dem durch die Literaturrecherche und den eigenen Studien gewonnen vorliegenden Datensatz unter Berücksichtigung verschiedener Qualitätsmerkmale ausgewählt (vgl. Kap. 8.3 im Anhang). Zur besseren Übersicht wurden die empfindlichsten Organismen und die entsprechenden Effektkonzentrationen aus Kurzzeit- und Langzeitstudien in Tab. 2.51 zusammengetragen. Diese Daten dienen als Grundlage für die Risikoprüfung in Kapitel 4.

Tab. 2.51: Zusammenfassung der empfindlichsten Organismen und Endpunkte aus in der wissenschaftlichen Literatur verfügbaren und aus eigenen Untersuchungen hergeleiteten Effektdaten zu den ausgewählten Substanzen.

Testsubstanz	Testorganismus	Testsystem (Endpunkt)	Effektkonzentration	Referenz
CBZ	<i>D. magna</i>	Akuter Toxizitätstest (Immobilisierung)	EC _{50/48 h} = 13,8 mg/L	Ferrari et al. (2003)
	<i>C. dubia</i>	Reproduktionstest (Reproduktion)	NOEC _{7 d} = 25 µg/L	Ferrari et al. (2003)
	<i>C. riparius</i>	Sediment-Toxizitätstest (Schlupfrate)	NOEC < 0,14 mg/kg TG Sediment ^a	Oetken et al. (eingereicht)
SMX	<i>S. subspicatus</i>	Algenwachstum-inhibitionstest (Zellvermehrung)	EC _{50/72 h} = 3,16 mg/L NOEC _{72 h} = 2,5 mg/L	vorliegende Arbeit
	<i>L. gibba</i>	Phototoxizitätstest (Frondzahl)	NOEC _{7 d} = 10 µg/L	Brain et al. (2004)
EE2	<i>S. subspicatus</i>	Algenwachstum-inhibitionstest (Zellvermehrung)	EC _{50/72 h} = 840 µg/L	Kopf (1997)
	<i>D. rerio</i>	Langzeit-Toxizitätstest (Mortalität)	NOEC _{28 d} = 10 ng/L	Wenzel et al. (2001)
	<i>D. rerio</i>	Multigenerationsstudie (Befruchtungsrate)	NOEC _{34 Wo.} = 0,3 ng/L	Wenzel et al. (1999)
AHTN	<i>P. subcapitata</i>	Algenwachstum-inhibitionstest (Biomasseproduktion)	EC _{50/72 h} = 468 µg/L	van de Plassche & Balk (1997)
	<i>P. promelas</i>	„Early Life Stage“-Studie (Larvalentwicklung und -wachstum)	NOEC _{36 d} = 35 µg/L	van de Plassche & Balk (1997)

^a: basierend auf gemessenen Konzentrationen

3 Expositionsabschätzung für die ausgewählten PPCPs

Für die Durchführung einer Umweltrisikobewertung sind verlässlich abgeschätzte, zu erwartende Umweltkonzentrationen (PECs – „*predicted environmental concentrations*“) oder gemessene Umweltkonzentrationen (MECs – „*measured environmental concentrations*“) der jeweiligen Substanz unerlässlich. Für die Expositionsabschätzung sind im besten Fall sowohl PECs als auch MECs der zu bewertenden Substanz vorhanden. Zuverlässige und repräsentative gemessene Expositionsdaten sollten vorrangig verwendet werden (EC, 2003). Allerdings sollten mit Modellen hergeleitete Konzentrationen in die Entscheidungsfindung zu einer für die Risikocharakterisierung repräsentativen PEC mit einbezogen werden (EC, 2003), da auch gemessene Daten in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren eine große Varianz aufweisen können.

In einem ersten Schritt wurden zunächst für die vier in dieser Arbeit untersuchten PPCPs mit verschiedenen Modellen PECs für Oberflächengewässer berechnet. Die Berechnungen basierten dabei auf Verschreibungs- und Verbrauchszahlen aus Deutschland und der EU. In einem zweiten Schritt wurden aus der wissenschaftlichen Literatur Quellen recherchiert, welche gemessene Konzentrationen dieser Substanzen in aquatischen Kompartimenten dokumentieren.

Um die Qualität bzw. die Adäquanz der gemessenen Expositionsdaten für die Verwendung in einer Expositionsabschätzung zu beurteilen, wurden die recherchierten Quellen und die darin enthaltenen Daten anhand des Kriterienkatalogs im *Technical Guidance Document TGD* (EC, 2003) ausgewertet. Die wichtigsten Kriterien bei dieser Auswertung sind die chemisch-analytische Methodik und die Repräsentativität der Daten und deren statistische Auswertung. Die Anwendung dieser Qualitätskriterien verbessert die Verlässlichkeit und somit die Aussagekraft der Expositionsabschätzung in der Umweltrisikobewertung. Von den recherchierten gemessenen Umweltkonzentrationen wurden somit die für die Expositionsabschätzung am geeignetsten beurteilten Daten ermittelt und von diesen durchschnittliche Umweltkonzentrationen für Oberflächengewässer hergeleitet (MEC_{OG}). Die so ermittelten MECs wurden mit den über die verschiedenen Modelle abgeschätzten PECs verglichen, wobei die den PECs zu Grunde liegenden Modelle kritisch betrachtet und diskutiert wurden. Dies geschah zum einen, um die Vorhersagekraft der Berechnungsmodelle zu überprüfen, und zum anderen, um adäquate Umweltkonzentrationen für die Verwendung in der verfeinerten Risikocharakterisierung zu erhalten (vgl. Kap. 4).

Die durchgeführte Recherche und Auswertung von Literaturdaten erhebt nicht den Anspruch auf Vollständigkeit, sondern soll anhand von Beispielen die große Varianz der Datenqualität in Bezug auf ihre Anwendbarkeit in einer Umweltrisikobewertung verdeutlichen.

3.1 Abschätzung der „predicted environmental concentration“ – PEC

Gemessene Konzentrationen von Umweltchemikalien gibt es verständlicherweise nur von Substanzen, die bereits in die Umwelt ausgebracht wurden und in messbaren Konzentrationen in Gewässern vorkommen. Für neue, durch Behörden zuzulassende Substanzen werden zum Zwecke der Expositionsabschätzung die zu erwartenden Umweltkonzentrationen (PECs) mit Modellen abgeschätzt. Für die Berechnung der PECs in deutschen Oberflächengewässern (PEC_{OG-dt}) der hier ausgewählten PPCPs wurden mehrere Modelle herangezogen. Zwei dieser Modelle wurden im Diskussionspapier bzw. im Richtlinienentwurf zur Durchführung von Risikobewertungen für Humanpharmaka von der EMEA vorgeschlagen (EMA, 2001, 2003a). Das dritte Modell ist das Computerprogramm EUSES Version 2.0 „European Union System for the Evaluation of Substances“ (EC, 2004). Während die von der EMEA vorgeschlagenen Modelle speziell auf die Expositionsabschätzung von Humanpharmaka ausgerichtet sind, ist EUSES ein Programm, welches bei der Umweltrisikobewertung von Neu- und Altstoffen sowie Bioziden nach dem TGD zum Einsatz kommt.

Das im Diskussionspapier (EMA, 2001) vorgeschlagene Berechnungsmodell basiert auf prognostizierten Verkaufszahlen bzw. Verordnungsmengen des Arzneimittels (Gleichung 3.1).

$$PEC_{OG} [g/L] = \frac{A \times (100 - R)}{365 \times P \times V \times D \times 100}, \quad [\text{Gleichung 3.1}]$$

wobei A [kg] = vorhergesagte Verkaufs- bzw. Verordnungsmenge pro Jahr,
 R [%] = Entfernungsrate des Wirkstoffs in der Kläranlage (z.B. durch Bioabbau oder Adsorption an Schlammpartikel),
 P = Bevölkerungszahl der betrachteten geographischen Region,
 V [m³] = Volumen des Abwassers pro Person und Tag,
 D = Verdünnungsfaktor des Abwassers im Oberflächengewässer.

Die jährlichen Verordnungsmengen der in dieser Arbeit betrachteten Pharmaka stammen vom Institut für Medizinische Statistik IMS (BLAC, 2003) für das Jahr 2001. Die Produktions-, bzw. Verbrauchsmenge von Tonalid (AHTN) stammt aus einem OSPAR-Bericht (OSPAR, 2000) (s. Abschnitt 2.1.2). Von den untersuchten Substanzen ist mit Ausnahme des AHTN bekannt, dass sie nicht leicht abbaubar sind (vgl. Tab. 8.1 im Anhang), weshalb die Entfernungsrate R gleich 0 gesetzt wurde. Für das potentiell abbaubare AHTN (van de Plassche & Balk, 1997) wurde eine Entfernungsrate von 30% angenommen. Ende 2002 betrug die Bevölkerungszahl P in Deutschland 82.537.000 Einwohner (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2003, <http://www.destatis.de>). Für die hier durchgeführten Berechnungen, basierend auf den Verordnungsmengen aus dem Jahr 2001, wurde für P ein Wert von 82 Millionen Einwohner eingesetzt. Der Eintrag in die Umwelt über die Kläranlage stellt in diesem Modell den alleinigen Eintragspfad dar. Das Abwasservolumen V wird im Diskussionspapier (EMA, 2001) für die EU mit durchschnittlich 150-300 L/d angegeben. Für die Modellberechnung wurde ein Wert von 200 L/d verwendet. Als Verdünnungsfaktor D wurde der im TGD für in Verbrauchsgüter enthaltene Substanzen empfohlene Durchschnittswert von 10 eingesetzt.

Ferner wird bei diesem Modell vereinfachend impliziert, dass eine zeitlich gleichmäßige Verteilung der Einnahme und somit auch der Ausscheidung über das gesamte Jahr stattfindet und eine örtliche Gleichverteilung im Oberflächengewässer eintritt.

Im Richtlinienentwurf (EMA, 2003a) wurde ein neues Rechenmodell für die anfängliche Expositionsabschätzung vorgestellt, welches primär auf der maximalen Tagesdosis des Wirkstoffes eines Arzneimittels beruht (Gleichung 3.2). Zusätzlich wurde ein Faktor für den Markterfolg („*factor for market penetration*“ F_{pen}) eingeführt, der den erwarteten Anteil der Bevölkerung darstellt, der regelmäßig, bzw. täglich mit dem entsprechenden Pharmakon behandelt wird.

$$PEC_{OG} [mg / L] = \frac{DOSE_{ai} \times F_{pen}}{V \times D \times 100}, \quad [\text{Gleichung 3.2}]$$

wobei $DOSE_{ai}$ [mg] = maximale Tagesdosis des Arzneimittelwirkstoffes pro Person (DDD),
 F_{pen} [%] = Faktor für den Markterfolg des Pharmakons,
 V [L] = Volumen des Abwassers pro Person und Tag,
 D = Verdünnungsfaktor des Abwassers im Oberflächengewässer.

Als maximale Tagesdosis $DOSE_{ai}$ des Arzneimittelwirkstoffes wurde für die hier untersuchten Substanzen die von der WHO definierte Tagesdosis DDD (*defined daily dose*) verwendet (WHO Collaborating Centre, 2003) (s. Abschnitt 2.1.1). Als Faktor für den Markterfolg F_{pen} wurde der vorgegebene Standardwert von 1% eingesetzt, d.h. es wird angenommen, dass 1% der Bevölkerung regelmäßig das Arzneimittel verwendet. Für das Abwasservolumen V und der Verdünnungsfaktor D wurden dieselben Werte eingesetzt wie beim ersten Modell (Gleichung 3.1). Somit ist $DOSE_{ai}$ (DDD) die einzige variable Größe in Gleichung 3.2, d.h. die PEC_{OG} korreliert direkt mit der maximalen Tagesdosis. Für den synthetischen Moschusduftstoff AHTN ist keine definierte Tagesdosis verfügbar, weshalb die PEC-Abschätzung für AHTN nur mit der Gleichung 3.1 durchgeführt wurde.

Die Expositionsabschätzung mittels der Gleichung 3.2 dient zur anfänglichen PEC-Abschätzung in Phase I der Umweltrisikobewertung gemäß EMA (2003a). Überschreitet diese den Schwellenwert von 10 ng/L, so wird die Umweltrisikobewertung in Phase II des Bewertungskonzepts mit einer verfeinerten PEC durchgeführt (vgl. Abschnitt 1.4.2). In Stufe A der Phase II erfolgt die verfeinerte PEC-Abschätzung, indem ein realistischer, prognostizierter Faktor für den Markterfolg (F_{pen}') unter Einbringung der voraussichtlich zu erwartenden Gesamtmenge des Wirkstoffs, die in einem Jahr verordnet bzw. verbraucht wird, berechnet wird (Gleichung 3.3).

$$F_{pen}' [\%] = \frac{A \times 10^8}{DOSE_{ai} \times P \times 365}, \quad [\text{Gleichung 3.3}]$$

wobei A [kg] = vorhergesagte Verkaufs- bzw. Verordnungsmenge pro Jahr,
 $DOSE_{ai}$ [mg] = maximale Tagesdosis des Arzneimittelwirkstoffes pro Person (DDD),
 P = Bevölkerungszahl der betrachteten geographischen Region.

Der verbesserte F_{pen} wird in Gleichung 3.2 eingesetzt und die so erhaltene verfeinerte PEC wird zu einer ersten quantitativen Risikocharakterisierung im Vergleich mit der aus akuten Effektdaten abgeleiteten PNEC verwendet. Indiziert diese Risikocharakterisierung ein nicht vertretbares Risiko für die aquatische Umwelt, so wird die Umweltrisikobewertung in Stufe B der Phase II fortgeführt, wo erneut eine Verbesserung und Verfeinerung der PEC-Berechnung vorgenommen wird.

Diese zweite verbesserte PEC-Abschätzung in Stufe B der Phase II (EMEA, 2003a) beinhaltet teilweise Erkenntnisse aus den in der Stufe A durchgeführten Studien zum Abbauverhalten der Substanz, aber auch Informationen zum Ausscheidungsmuster und Metabolismus des Arzneimittelwirkstoffs im Menschen aus toxikologischen Studien, die in dem Marktzulassungsantrag des Arzneimittels enthalten sind. Aus zwei Gründen wurde die PEC-Berechnung der Stufe B allerdings nicht durchgeführt. Erstens wurden durch die Literaturrecherche zuverlässige, gemessene Konzentrationen der untersuchten Substanzen in Oberflächengewässer ermittelt, und zweitens waren die Angaben im Richtlinienentwurf zur Durchführung dieser PEC-Berechnung unvollständig und daher nicht durchzuführen. Außerdem ist nach dem vorgeschlagenen Berechnungsmodell der Stufe B der Phase II die Größe der verfeinerten PEC sehr stark von der Ausscheidungsmenge der unveränderten Substanz durch den Menschen und von dem Anteil der Substanz, der an im Wasser vorhandene Schwebstoffe adsorbiert, abhängig. Daten zu beiden Parameter sind jedoch in der Literatur kaum vorhanden und weisen meist eine große Variabilität auf, weshalb zuverlässige, gemessene Daten für die Risikobewertung zu bevorzugen sind.

Beim Einsatz von EUSES (EC, 2004) wurde die Expositionsabschätzung auf regionaler Ebene durchgeführt, d.h. die Verbrauchs- oder Verordnungsmengen einer Substanz wurden auf ein Bevölkerungsäquivalent von 20 Millionen normalisiert. Der Anteil der Haushalte, welche an ein Abwassersystem angeschlossen sind, wurde im Jahr 1995 für Deutschland auf 89% festgestellt (EC, 2003), weshalb dieser Parameter bei der PEC-Berechnung mit EUSES auf 90% eingestellt wurde. Ansonsten wurden die Grundeinstellungen des Programms, welche die Umweltkompartimente charakterisieren, beibehalten. Von den Grundeinstellungen abweichende Eingaben in EUSES bezüglich der Eigenschaften der untersuchten Substanzen sind in Tab. 8.53 im Anhang dargestellt.

3.2 Umweltkonzentrationen der ausgewählten PPCPs

Wissenschaftliche Literatur, welche Informationen zu gemessenen Konzentrationen der ausgewählten PPCPs in Oberflächengewässern bereitstellt, wurde mittels üblicher Datenbanken (z.B. *Current Contents*, *MedLine*) oder über im Internet verfügbare Suchmaschinen wie *Google* (www.google.de) oder *Scirus* (www.scirus.com) recherchiert. Die verwendeten Suchbegriffe waren die Namen der Substanzen und Begriffe wie „*environmental concentration*“, „*surface water*“, und „*exposure assessment*“. Da Sekundärliteratur wie Buchkapitel oder

Übersichtsartikel im Allgemeinen keinen detaillierten experimentellen Teil enthalten, wurden entsprechende Quellen in dieser Auswertung nicht berücksichtigt.

3.2.1 Bewertungsmethoden der Datenqualität von gemessenen Umweltkonzentrationen

Die Auswertung und Bewertung der Daten der in der Literatur verfügbaren MECs der untersuchten Substanzen erfolgte anhand der im TGD empfohlenen Qualitätskriterien. Dieser Kriterienkatalog gibt eine Hilfestellung für die Bewertung der Verlässlichkeit, Relevanz und Adäquanz der Daten in Bezug auf ihre Verwendbarkeit für die Expositionsabschätzung in einer Umweltrisikobewertung. Dadurch sollen für die Expositionsabschätzung adäquate und repräsentative gemessene Expositionsdaten ermittelt werden. Die Bezeichnung „adäquat und repräsentativ gemessene Daten“ bezieht sich hauptsächlich auf (1) die analytische Qualität der Untersuchung, welche durch die Auswahl einer angemessenen Methodik und ihre akkurate Umsetzung sichergestellt werden kann, und (2) die Planung und Durchführung der Probenahme in Bezug auf deren zeitlichen und räumlichen Umfang und der daraus folgenden Repräsentativität der Proben (EC, 2003).

Tab. 3.1: Qualitätskriterien für gemessene Expositionsdaten gemäß TGD (EC, 2003).

Kriterium:	Kategorie:	
	1 Uneingeschränkt für Expositionsabschätzung gültig	2 Mit Einschränkung für Expositionsabschätzung gültig ¹
1. Was wurde analysiert	x	x
2. Analytische Methode	x	x
3. Angabe der Einheiten	x	x
4. Bestimmungsgrenze	x	x
5. Bestimmung von Blindproben	x	
6. Wiederfindungsraten	x	
7. Reproduzierbarkeit der Wiederfindungsraten	x	
8. Probenahme	x	
9. Schema/Häufigkeit der Probenahme	x	x
10. Ort der Probenahme	x	x
11. Datum der Probenahme	x	Mindestangabe: Jahr
12. Charakterisierung des untersuchten Kompartiments	x	
13. Nähe zu Eintragsquellen (Anteil an geklärtem Abwasser)	x	x
14. Statistische Auswertung	x	x
15. Berücksichtigung der Konzentrationen < BG	x	x

¹: kann zur Unterstützung der Datenlage bei der Expositionsabschätzung herangezogen werden

Die angewendeten und im TGD postulierten Kriterien sind in Tab. 3.1 dargestellt. Um die Datenqualität Kategorie 1 zuordnen zu können, sollten alle Kriterien in ausreichendem Maße erfüllt oder angegeben sein. Um die Daten in Kategorie 2 einzuteilen sind Mindestanforderungen gestellt, wie z.B. die Beschreibung der analytischen Methode und die Erfüllung von

Qualitätsstandards wie die Angabe der Bestimmungsgrenzen (Quantifizierungsgrenzen) und deren Definition. Diesen Kriterien wird ein höheres Gewicht beigemessen, als z.B. die Angabe von evtl. positiven Befunden in den Blindproben oder die exakte Charakterisierung des untersuchten Kompartiments, die zum Erreichen der Kategorie 2 nicht zwingend erforderlich sind. Für weitere Details zur Definition der Qualitätskriterien sei auf das TGD (EC, 2003), ECETOC (1999) und Holt et al. (2000) verwiesen.

Zwecks der praktischen Umsetzung und Anwendung der Qualitätskriterien auf die ausgewerteten Publikationen und der darin enthaltenen Expositionsdaten wurden die verfügbaren Informationen zu jedem Kriterium drei Klassen zugeordnet (+, 0 und -). Im Anhang (Abschnitt 8.2.1) wird die Zuordnung der Kriterien in eine der drei Klassen für jede Substanz detailliert beschrieben. Die Klassifizierungen der einzelnen Kriterien wurde für jede Publikation und jede Substanz aufsummiert (siehe Abschnitt 8.2.2 und Tab. 8.2-8.5 im Anhang). Die Publikationen bzw. die darin enthaltenen Expositionsdaten mit den höheren Bewertungen wurden entsprechend der Kategorie 1 (,ohne Beschränkung für die Expositionsabschätzung gültig') und die mit niedrigeren Bewertungen wurden der Kategorie 2 (,mit Beschränkung für die Expositionsabschätzung gültig') zugeordnet. Die Einteilung in beide Kategorien erfolgte allerdings nicht ausschließlich nach der Anzahl der zugeteilten „+“, „0“ oder „-“, sondern, da wie bereits erwähnt den einzelnen Kriterien unterschiedliche Gewichtung beigemessen wurde, wurde von Fall zu Fall entschieden, ob insgesamt zuverlässige und aussagekräftige und somit repräsentative Daten für die Expositionsabschätzung vorliegen. Somit kann es zu insgesamt positiven Beurteilungen kommen (Kategorie 1), obwohl möglicherweise nicht alle Kriterien erfüllt waren.

3.2.2 Beurteilung der Datenqualität der recherchierten Quellen

Insgesamt wurden 37 Publikationen, die Daten zu Konzentrationen der ausgewählten PPCPs in Oberflächenwässer bereitstellen, nach den im TGD beschriebenen Qualitätskriterien ausgewertet. 19 Publikationen wurden als ,uneingeschränkt für die Verwendung zur Expositionsabschätzung gültig' kategorisiert. In den meisten Fällen, in denen Daten als ,nicht uneingeschränkt gültig' bewertet wurden, war dies auf unzureichende oder fehlende Angaben zur Probenahmeprozedur und/oder zum Probenahmeschema, bzw. Häufigkeit der Probenahme, und somit zur Repräsentativität der Daten zurückzuführen.

Dies mag zum Teil durch spezifische Zielsetzungen der Autoren begründet sein. Oft war das Ziel einer Arbeit, neue analytische Verfahren zu entwickeln und zu etablieren, um eine Substanz damit in möglichst niedrigen Konzentrationen nachweisen zu können, wie es z.B. häufig der Fall bei der Analyse von EE2 war. Dabei wurde meistens weniger Wert auf eine detaillierte Beschreibung von z.B. dem Probenahmeschema gelegt. Andererseits kam es vor, dass Studien ein umfangreiches Probenahmeprogramm mit entsprechend vielen Messpunkten beschreiben, allerdings, abgesehen von einem Verweis auf eine die analytische Methode beschreibende Arbeit, Angaben zu z.B. Bestimmungsgrenzen und Reproduzierbarkeit der Wiederfindung fehlen. Solche Arbeiten entsprechen dem von Holt et al. (2000) beschriebenen

„Viele-Daten-Wenig-Informationen-Syndrom“, wie es in der Vergangenheit häufig bei Berichten von *Monitoring*-Programmen beobachtet wurde.

In einer einzigen der 37 ausgewerteten Arbeiten wurde angegeben, welcher Wert für Konzentrationen $< BG$ in der statistischen Auswertung, falls durchgeführt, verwendet wurde. In mehreren Arbeiten kam zum Ausdruck, dass die Messpunkte mit Konzentrationen $< BG$ in die Berechnung von z.B. Medianen überhaupt nicht einbezogen wurden. Dies wird z.B. dann ersichtlich, wenn der gemessene Minimumwert größer als die Bestimmungsgrenze angegeben wird, obwohl nicht alle Proben oberhalb dieser Grenze liegen. Eine solche Vorgehensweise kann zu beträchtlichen Fehlern führen, besonders in dem Fall, wenn nur eine geringe Anzahl an Proben Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze aufweisen. Werden die Konzentrationen $< BG$ in statistischen Berechnungen nicht berücksichtigt, so führt dies zu überschätzten Medianen oder 90. Perzentilen. Werden anderenfalls die Konzentrationen $< BG$ gleich 0 gesetzt, so führt dies eventuell zu Unterschätzungen der realen Umweltkonzentration. Somit führt die fehlende Angabe des statistischen Umgangs mit den Konzentrationen $< BG$ stets zu fehlerhaften Schlussfolgerungen.

3.2.3 Herleitung der „measured environmental concentrations“ – MECs

Die Mehrheit der als adäquat für die Verwendung in der Expositionsabschätzung eingestuften Publikationen enthielten Umweltkonzentrationen der ausgewählten PPCPs, die in deutschen Gewässern gemessen wurden (Tab. 3.2). Von diesen Daten wurden für jede Substanz durchschnittliche gemessene Umweltkonzentrationen für deutsche Oberflächengewässer, basierend auf den jeweiligen 90. Perzentilen, ermittelt (MEC_{OG-dt}). Die MEC_{OG-dt} werden später in Kapitel 4 bei den durchgeführten Umweltrisikobewertungen als Umweltkonzentrationen der verfeinerten Expositionsabschätzungen Verwendung finden. Analog zu den MEC_{OG-dt} basierend auf den 90. Perzentilen wurden durchschnittliche Mediane für deutsche Oberflächengewässer ($Median_{OG-dt}$) berechnet (Tab. 3.2).

Zwecks Praktikabilität und Vergleichbarkeit mit den angewendeten Expositions-Modellen wurden die mit der beschriebenen Methode ermittelten regionalen MECs für Oberflächengewässer auf die „Region Deutschland“ bezogen. Innerhalb von Regionen mit künstlichen Grenzen (politische Landesgrenzen), aber auch Länder übergreifend, gibt es aus geographischer, hydrologischer und biologischer Sicht besser geeignete Begrenzungen wie z.B. Flusseinzugsgebiete. Diese können sich bezüglich der Konzentrationen von Humanpharmaka bzw. Umweltchemikalien im Allgemeinen, in Abhängigkeit von der Populationsdichte, dem Wasservorkommen und des -verbrauchs pro Populationsäquivalent und dem Konsumverhalten deutlich unterscheiden.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Modelle (EMEA und EUSES) sind Werkzeuge zur Abschätzung von Umweltkonzentrationen, die eine fiktive „Einheitsumwelt“ voraussetzen und räumliche und zeitliche Variabilität der Landschaften, Flussläufe und Emmissionen nicht berücksichtigen. Aus diesem Grund können solche Modelle die reale Umwelt nicht genau

abbilden. Sie sollten daher vorwiegend zu Beginn, in den frühen Phasen (*screening*) von Umweltrisikoprüfungen eingesetzt werden, soweit keine gemessenen Daten vorliegen.

Seit Mitte der 1990er Jahre wird ein Modell entwickelt und validiert, welches regionale und lokale Umweltkonzentrationen bezogen auf spezifische Flusseinzugsgebiete ermitteln kann: GREAT-ER (*Geography-referenced Regional Exposure Assessment Tool for European Rivers*). Dieses ist ein Instrument, welches unterstützt durch GIS-Daten (*Geographic Information System*) und unter Berücksichtigung von Substanzeigenschaften, für bestimmte Flusseinzugsgebiete zur Abschätzung von PECs herangezogen werden kann, wobei für jeden beliebigen Ort oder Flussabschnitt innerhalb eines Flusseinzugsgebiets ein spezifischer PEC errechnet werden kann (Feijtel et al., 1997). Dieses Modell kann inzwischen für mehrere Flusssysteme in Europa eingesetzt werden. Es ist als Computer-Programm auf der Internetseite von GREAT-ER frei zugänglich (siehe www.great-er.org). Es konnte für mehrere Substanzen gezeigt werden, dass die mittels GREAT-ER berechneten PECs mit den 90. Perzentilen gemessener Konzentrationen gut übereinstimmen, die realen Umweltkonzentrationen dabei aber nicht unterschätzt werden (z.B. Wind et al., 2004). Schowanek & Webb (2002) wendeten GREAT-ER zur PEC-Berechnung mehrerer Pharmaka in den Flusseinzugsgebieten der Aire (UK), des Lambro (Italien) und der Ruhr (D) an.

Für die Umweltrisikobewertung von Substanzen ist eine gebietsbezogene Expositionsabschätzung (Flusseinzugsgebiet) sinnvoll, vor allem in Gebieten, in denen auf Grund der geographischen und demographischen Situation erhöhte Umweltkonzentrationen zu erwarten sind, wie z.B. in kleineren Flüssen des Ruhrgebiets. Eine solche Betrachtung sollte vor allem dann zur Anwendung kommen, wenn in höheren Stufen von Umweltrisikoprüfungen keine gemessenen Daten zur Verfügung stehen.

Soweit die Datenlage für die hier untersuchten Substanzen es zuließ (im Fall des CBZ), wurde auf gebietsbezogene Unterschiede bezüglich der gemessenen Umweltkonzentrationen in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

Gemessene Umweltkonzentrationen von Carbamazepin

Fünf von acht ausgewerteten Quellen für CBZ wurden nach den im TGD beschriebenen Qualitätskriterien als „für die Expositionsabschätzung uneingeschränkt gültig“ kategorisiert. Die in diesen Arbeiten (Sacher et al., 1998; Ternes, 1998; Metcalfe et al., 2003b; Stackelberg et al., 2004; Wiegel et al., 2004) gemessenen Konzentrationen sind untereinander vergleichbar und reflektieren einen verlässlichen Konzentrationsbereich, innerhalb dessen CBZ in der aquatischen Umwelt zu erwarten ist (Tab. 3.2). Die Maximalwerte und 90. Perzentile liegen im Bereich der für CBZ abgeschätzten Umweltkonzentrationen (PEC_{OG-dt}), welche mit den Modellen der EMEA (EMA, 2001, 2003) und EUSES (EC, 2004) berechnet wurden (Tab. 3.3). Die in der Elbe gemessenen Konzentrationen von Sacher et al. (1998) und Wiegel et al. (2004) liegen dazu vergleichsweise niedrig. Dies ist möglicherweise auf ein anderes Konsumverhalten bzw. Verschreibungsmuster im östlichen Teil Deutschlands oder auf eine hohe Verdün-

nungsrate des Flusses zurückzuführen. Für die Berechnung der MEC_{OG-dt} wurden von den in Deutschland ermittelten Umweltkonzentrationen die Daten von Sacher et al. (1998) und Ternes (1998) berücksichtigt, da von Wiegel et al. (2004) keine 90. Perzentile angegeben wurden. Der daraus resultierende MEC_{OG-dt} liegt bei 517 ng/L (Tab. 3.2). Für die Berechnung des Mittelwerts aus den in den Quellen angegebenen Medianen wurden allerdings die Daten von Wiegel et al. (2004) mit einbezogen (insgesamt 13 Werte für verschiedene Gewässer) was in eine mittlere Konzentration von 318 ng/L resultierte. In dieser Berechnung wurde für den von Sacher et al. (1998) in der Elbe unterhalb der BG gemessene Wert, der halbe Wert der BG (10 ng/L) verwendet.

Am Beispiel des CBZ werden die oben erwähnten Unterschiede zwischen in verschiedenen Flusseinzugsgebieten gemessenen Umweltkonzentrationen deutlich, wobei in diesem Fall die in der Elbe gemessenen CBZ-Konzentrationen im Vergleich zu den im Rhein gemessenen Konzentrationen um eine Größenordnung niedriger liegen. Durch die Einbeziehung der in der Elbe gemessenen CBZ-Konzentrationen in die Berechnung des MEC_{OG-dt} , wird dieser verringert. Würde man eine gebietsbezogene Betrachtung für das Einzugsgebiet des Rheins durchführen, so ergäbe sich ein Mittelwert aus den im Rhein gemessenen 90. Perzentile (Sacher et al., 1998; Ternes, 1998) von 755 ng/L.

Gemessene Umweltkonzentrationen von Sulfamethoxazol

SMX zählt zu den in den höchsten Konzentrationen in der Umwelt angetroffenen Antibiotika (BLAC, 2003). Trotzdem liegen nur wenige Arbeiten über Messungen von Umweltkonzentrationen vor. Fünf der sieben in die Auswertung einbezogenen Publikationen wurden der Bewertungskategorie 1 zugeteilt. Zwei dieser fünf Arbeiten liefern Daten zu gemessenen Umweltkonzentrationen von SMX in deutschen Gewässern (Hirsch et al., 1999; Wiegel et al., 2004). Da von Wiegel et al. (2004) keine 90. Perzentile vorliegen (vgl. MEC_{OG-dt} für CBZ), wurde das 90. Perzentil von Hirsch et al. (1999) mit 140 ng/L als MEC_{OG-dt} übernommen. Der Bereich der in beiden Arbeiten gemessenen SMX-Konzentrationen ist durchaus vergleichbar, was sich in den sehr ähnlichen Medianen verdeutlicht. Der durchschnittliche Median wurde mit 38 ng/L berechnet (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: In Oberflächengewässern gemessene Konzentrationen der ausgewählten PPCPs. Für die Expositionsabschätzung uneingeschränkt gültig kategorisierte Daten sind fett gedruckt. Für die Berechnung der durchschnittlichen Mediane (Median_{OG-dt}) und 90. Perzentile (MEC_{OG-dt}) wurden nur Werte der für die Expositionsabschätzung uneingeschränkt gültig kategorisierten Daten und in deutschen Oberflächengewässern gemessene Konzentrationen berücksichtigt. Alle Konzentrationen in ng/L.

PPCP	n	n > BG oder n > NG	Min. ^a	Max. ^a	Median ^a	90. Perzentil ^a	BG	NG	Ort	Referenz	Median _{OG-dt}	MEC _{OG-dt}
CBZ	768	-	< BG - 640	20 - 7100	< BG - 1200	-	20	-	D, Elbe und Zuflüsse	Wiegel et al., 2004	318	517
	1022	-	< BG	3000	65	-	20	-	D, 97 Wasserläufe im Bundesstaat Sachsen			
	161	138	-	2100	290	690	20	-	D, Rhein	Sacher et al., 1998		
	12	12	~ 10	~ 1500	-	-	-	11	USA	Stackelberg et al., 2004		
	11	8	< NG	650	185 ^k	-	-	1	Canada, Detroit River, Hamilton Harbour, Flüsse und Seen	Metcalf et al. 2003b		
	14	10		310	120 ^k							
	15	1		20	20 ^k							
	26	24	-	1100	250	820	-	30	D, Rhein und Zuflüsse	Ternes, 1998		
	7 ^c	7	101	272	153	-	-	-	D, Schussen	Pfluger et al., 2001		
	17	17	30	250	-	-	-	8,7	CH, Aa, Aabach	Öllers et al., 2001		
	35	3	-	170	< BG	42	20	-	D, Elbe	Sacher et al., 1998		
	8	7	< BG	140	65	-	30	-	D, Elbe (1998)	Wiegel et al., 2004		
	28	28	35	60	-	-	-	8,7	CH, Greifensee	Öllers et al., 2001		
	1	1	-	0,7	-	-	-	0,0008	Canada, Otonabee River	Miao & Metcal- fe, 2003		

Fortsetzung Tab. 3.2:

PPCP	n	n > BG oder n > NG	Min. ^a	Max. ^a	Median ^a	90. Perzentil ^a	BG	NG	Ort	Referenz	Median _{OG-dt}	MEC _{OG-dt}
EE2	70	4	-	273	9,4 ^k	-	5,0	-	USA	Kolpin et al., 2002a,b	< BG	< 0,625
	13	-	2	15	-	-	-	1,0	UK (Südost)	Aherne & Briggs, 1989		
	53	5	1,0 (< BG) ^g	6,7	3,4 (< BG) ^g	- (1,0) ^g	1,0	-	D	Wenzel et al., 1998		
	8 ^c	6	1,2	5,0	-	-	-	-	D, Schussen	Pfluger et al., 2001		
	135 90	21 22	< NG	4,6 4,0	-	-	-	0,4-0,5	UK (Südost) River Nene, River Lea	Williams et al. 2003		
	42	42	-	-	1,1-2,9 ^m	-	-	0,02- 0,24 ^{pg}	F, Seine (Paris)	Cargouët et al. 2004		
	31	15	0,1 ^h	5,1	0,4	-	-	0,1	D (Süd)	Kuch & Ballschmit- ter, 2001		
	16	3	-	4,3	< NG	-	-	0,1-0,3	NL	Belfroid et al., 1999		
	10	6	-	4,0	-	2,0	1,0	-	D	Stumpf et al., 1996		
	40 39	12 20	< BG < BG	2,5 3,0	< BG 0,1	-	0,05	-	D	Adler et al., 2001 ⁱ		
	24	0	-	< NG	-	-	-	5,0	E (Barcelona)	Petrovic et al., 2002		
	15	0	-	< BG	-	(0,25) ^j	0,5	-	D	Ternes et al., 1999b		
	15	0	-	< BG	-	-	0,2	-	D, Elbe u. Zuflüsse	Stachel et al., 2003		

Fortsetzung Tab. 3.2:

PPCP	n	n > BG oder n > NG	Min. ^a	Max. ^a	Median ^a	90. Perzentil ^a	BG	NG	Ort	Referenz	Median _{OG-dt}	MEC _{OG-dt}
SMX	104	13	-	1900	150	-	50	-	USA	Kolpin et al., 2002a ^f	38	140
	84	16	-	520	66	-	23	-				
	52	26	-	480	30	140	20	-	D	Hirsch et al., 1999		
	5	4	< BG	85	45	-	0,6-2,5	0,2-0,9	D (Nord)	Hartig et al., 1999		
	8	7	< BG	70	45	-	30	-	D, Elbe (1998)	Wiegel et al., 2004		
	12	2	~ 3	~ 10	-	-	-	23-50	USA	Stackelberg et al., 2004		
	15	0	< NG	< NG	< NG	-	-	50	UK (Südost)	Ashton et al., 2004		
	-	0	-	< NG	-	-	-	50	UK	Hilton & Tho- mas, 2003		

Fortsetzung Tab. 3.2:

PPCP	n	n > BG oder n > NG	Min. ^a	Max. ^a	Median ^a	90. Perzentil ^a	BG	NG	Ort	Referenz	Median _{OG-dt}	MEC _{OG-dt}
AHTN	27	27	30	6800	390 ^d	3950 ^d	10	< 5	D, Berlin	Heberer et al., 1999	201	311
	28	28	-	1100	470	910	-	10	D, Berlin	Fromme et al., 2001		
	40	39	-	270	50	140						
	34	21	-	60	20	30						
	12	12	~ 250	~ 650	-	-	-	500	USA	Stackelberg et al., 2004		
	23	-	< NG	300	200 ^e	-	30	-	D, Ruhr	Eschke et al., 1994		
	9	9	2,3	186	43	-	-	1	CH	Buerge et al., 2003		
	-	-	-	116	-	-	30	20	D, Elbe	Lagois, 1996		
	31	31	24	88	73	83	-	2	D, Elbe	Winkler et al., 1998		
	-	-	-	75	-	-	-	-	CH, Glatt	Müller et al., 1996		
1	1	-	67	-	-	0,03	-	D, Elbe (Mündung)	Bester et al., 1998			
7	5	< BG	0,57	0,19 ^e	-	-	0,002	USA, Lake Mead	Osemwengie & Gerstenberger 2004			

n = Anzahl gemessener Proben; BG = Bestimmungsgrenze; NG = Nachweisgrenze; Min./Max. = gemessener Minimal-/Maximalwert; - = keine Angabe; ^a Min., Max., Median und 90. Perzentil wie in entsprechender Referenz angegeben; ^c 24 h-Mischproben; ^d auf Grundlage der in der Quelle angegebenen Einzelwerten berechnet; ^e Mittelwert; ^f die jeweils zwei Werte beziehen sich auf zwei unterschiedliche analytische Methoden; ^g unkorrekte statistische Auswertung, korrigierte Werte in Klammern (vgl. Abschnitt 8.2.2 im Anhang); ^h Minimalwert wie in der Quelle angegeben ist nicht korrekt, da Min. < NG; ⁱ alle Werte beziehen sich auf den Gesamt-EE2-Gehalt nach enzymatischer Spaltung von Konjugaten in den Proben; ^j für die Berechnung des MEC_{OG-dt} verwendeter Wert (= BG/2); ^k unkorrekte statistische Auswertung, da nur Werte > NG in die Berechnung des Median einbezogen wurden; ^m Mediane wurden aus jeweils 6 Proben von 7 Probenahmeorten gesondert berechnet.

Gemessene Umweltkonzentrationen von 17 α -Ethinylöstradiol

Die wissenschaftliche Literatur zu 17 α -Ethinylöstradiol (EE2) ist im Vergleich zu den anderen hier betrachteten Substanzen am umfangreichsten. In Anbetracht der niedrigen Effektkonzentrationen auf die Reproduktionsfähigkeit bei Fischen (z.B. Wenzel et al., 1999; vgl. Tab. 8.8 im Anhang) ist zur Durchführung einer Umweltrisikobewertung von EE2 eine präzise Bestimmung der Umweltkonzentrationen sehr wichtig. Auf Grund des innerhalb der letzten Jahre zunehmenden Verbrauchs an EE2 (vgl. Abb. 2.2) sind aktuelle Verbrauchszahlen zur PEC-Abschätzung, bzw. aktuelle Messergebnisse von Umweltkonzentrationen von Bedeutung.

Die zurzeit am geeignetste und verlässlichste Analysemethode zum Nachweis von EE2 in aquatischen Matrices ist die Gaschromatographie Elektrospray-Ionisations Tandem-Massenspektrometrie (GC-ESI-MS/MS). Ternes et al. (1999b) zeigten, dass bei der Detektion mit einfacher Massenspektrometrie (GC-MS) eine Überlagerung der „*peaks*“ im Spektrogramm durch eine bisher unbekannte Substanz zu Überbewertungen der EE2-Konzentrationen führte. Diese sich überlagernden *peaks* konnten durch die Anwendung von Tandem-Massenspektrometrie sicher aufgetrennt und quantifiziert werden. In der Mehrzahl von Arbeiten, bei denen EE2 in aquatischen Medien gemessen wurde, wurde allerdings die einfache Massenspektrometrie angewendet. Es ist also nicht auszuschließen, dass erhöhte Umweltkonzentrationen auf die Verwendung von einfacher MS zurückzuführen sind. Für die Einteilung in die Bewertungskategorien wurden deshalb konsequenterweise, unabhängig von der Bewertung der anderen Qualitätskriterien, Arbeiten, bei denen die einfache MS als Nachweismethode für EE2 verwendet wurde, als ‚nicht uneingeschränkt für die Expositionsabschätzung gültig‘ (Bewertungskategorie 2) eingestuft. Dadurch ergab sich, dass lediglich 4 von 13 ausgewerteten Publikationen zu EE2-Konzentrationen in Oberflächengewässern als ‚für die Expositionsabschätzung uneingeschränkt gültig‘ kategorisiert wurden.

Zwei dieser vier Publikationen (Wenzel et al., 1998; Ternes et al., 1999b) liefern Daten zu in Deutschland gemessenen EE2-Konzentrationen, welche zur Berechnung des Mittelwerts der gemessenen 90. Perzentile in deutschen Oberflächengewässern (MEC_{OG-dt}) herangezogen wurden. Ternes et al. (1999b) konnten in 15 Proben kein EE2 nachweisen, weshalb in Anlehnung an die Methode von Kushner (1976) und wie im TGD vorgeschlagen die Hälfte der Bestimmungsgrenze ($BG/2 = 0,25 \text{ ng/L}$) an Stelle des 90. Perzentils für die Berechnung der MEC_{OG-dt} verwendet wurde. Folglich wurde die MEC_{OG-dt} als $0,625 \text{ ng/L}$ berechnet (Tab. 3.2), jedoch als $< 0,625 \text{ ng/L}$ angegeben, da auf Grund der hier beschriebenen Berechnungsmethode kein exakter Wert angegeben werden kann und somit eine gewisse Unsicherheit besteht. Die gemessenen Mediane lagen bei diesen Arbeiten unterhalb der BG. Ein Durchschnittswert der Mediane wurde nicht berechnet sondern als $< BG$ angegeben.

Gemessene Umweltkonzentrationen von Tonalid

Insgesamt wurden 10 Publikationen zu AHTN-Konzentrationen ausgewertet, wovon 6 der Bewertungskategorie 1 zugeordnet wurden und wiederum 3 dieser 6 Publikationen Daten zu

deutschen Oberflächengewässern liefern (Winkler et al., 1998; Heberer et al., 1999; Fromme et al., 2001).

Fromme et al. (2001) teilten ihre Ergebnisse in 3 Kategorien ein, und zwar in Messungen von Konzentrationen in Oberflächengewässern mit starker, mittlerer und geringer Belastung mit geklärtem Abwasser. Dies resultierte in 3 verschiedene 90. Perzentile, wodurch sich ein insgesamt geringerer Mittelwert der 90. Perzentile ableiten lässt, der dadurch aber eine höhere Repräsentativität für Oberflächengewässer aufweist. Heberer et al. (1999), die ihre Untersuchungen zur gleichen Zeit in den selben Gewässern durchführten wie Fromme et al. (2001), führten bei der Darstellung ihrer Ergebnisse keine separate Betrachtung von Messungen in Abwassergräben mit hoher Abwasserbelastung und solchen in stärker verdünnten Oberflächengewässern durch. So kommt es, dass das von Heberer et al. (1999) berechnete 90. Perzentil einer Messung der AHTN-Konzentration in einem Abwasserkanal entspricht, der nahezu vollständig aus geklärtem Abwasser besteht. Dieser Wert übersteigt die sonst in Oberflächengewässern gemessenen AHTN-Konzentrationen um ca. eine Größenordnung (Tab. 3.2). Zur Berechnung der MEC_{OG-dt} wurden deshalb die 90. Perzentile der Arbeiten von Fromme et al. (2001) und Winkler et al. (1998), und außerdem der Median von Heberer et al. (1999) an Stelle des 90. Perzentils herangezogen. Die daraus resultierende MEC_{OG-dt} beträgt 311 ng/L, der durchschnittliche Median ergab 201 ng/L (Tab. 3.2).

3.3 PECs und MECs für die Umweltrisikobewertung

Bei der Auswertung von gemessenen Umweltkonzentrationen stellte sich heraus, dass ca. die Hälfte der in der Literatur veröffentlichten ausgewerteten Daten ausreichende Adäquanz für die Verwendung in der Expositionsabschätzung besaß (19 von 37 Publikationen). Von diesen lieferte wiederum ca. die Hälfte (9 Publikationen) Daten zum Vorkommen der ausgewählten PPCPs in deutschen Oberflächengewässern. Für die Bestimmung einer gebietsbezogenen PEC, die auf gemessenen Daten basiert, empfiehlt das TGD die Berechnung des Mittels aller 90. Perzentile von Messreihen an unterschiedlichen Messstandorten innerhalb des betrachteten Gebiets (EC, 2003). Demnach wurde jeweils der Mittelwert aus den 90. Perzentilen für eine Substanz berechnet (MEC_{OG-dt}), die aus Quellen stammten, welche nach der oben beschriebenen Methode als ‚für die Expositionsabschätzung uneingeschränkt gültig‘ (Kategorie 1) kategorisiert wurden und Konzentrationen in deutschen Oberflächengewässern enthielten. Die so abgeleiteten MEC_{OG-dt} sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.

Die Ergebnisse der PEC-Abschätzung nach dem im Diskussionspapier vorgeschlagenen Berechnungsmodell (EMEA, 2001) waren identisch mit der verfeinerten PEC-Abschätzung in Phase II Stufe A nach dem Modell des Richtlinienentwurfs (EMEA, 2003a) (Tab. 3.3). Dies entspricht den der Berechnung zu Grunde liegenden Formeln, die beide die zu erwartende Verkaufs- oder Verschreibungsmenge als bestimmenden Parameter beinhalten.

Tab. 3.3: Nach verschiedenen Modellen abgeschätzte Konzentrationen für deutsche Oberflächengewässer (PEC_{OG-dt}) und durchschnittlich gemessene Konzentrationen (90. Perzentile) in deutschen Oberflächengewässern (MEC_{OG-dt}) aus Literaturangaben in ng/L.

Substanz	PEC _{OG-dt} abgeschätzt gemäß				MEC _{OG-dt}
	EMEA 2001	EMEA 2003a Phase I	EMEA 2003a Phase II-A	EUSES 2004	
CBZ	1.460	5.000	1.460	1.570	517
SMX	895	10.000	895	1.020	140
EE2	0,79	0,13	0,79	0,77	< 0,625
AHTN	984	n.a.	n.a.	67	311

n.a.: nicht anwendbar

Mit Ausnahme der Daten für AHTN waren die mit dem EMEA-Modell von 2001 und EUSES berechneten PECs sehr ähnlich. Die aus gemessenen Daten hergeleitete MEC_{OG-dt} für AHTN wurde von der PEC nach EUSES ca. um das 5-fache unterschätzt. Die Ursache hierfür mag in der in EUSES gesetzten Annahme liegen, dass auf Grund des hohen K_{ow} von AHTN eine erhöhte Adsorption an Klärschlamm und suspendierte Partikel und somit eine stärkere Konzentrationsabnahme in der Wasserphase stattfindet. Dies entspricht offensichtlich nicht den gemessenen Befunden da, schon in gering mit Abwasser belasteten Oberflächengewässern annähernd die von EUSES berechnete AHTN-Konzentration gemessen wurde (Fromme et al., 2001; Tab. 3.2).

Für die Pharmazeutika konnten mit dem EMEA-Modell von 2001 Abschätzungen der PECs erreicht werden, die am ehesten den gemessenen Umweltkonzentrationen entsprachen. Im Fall von CBZ und SMX wurde ein Abstand von den berechneten PECs zu den aus gemessenen Daten hergeleiteten MEC_{OG-dt} eingehalten, der eine verlässliche Risikocharakterisierung zulässt. Im Fall von EE2 war die PEC jedoch fast gleich der MEC. Dabei muss berücksichtigt werden, dass den Berechnungen der PECs Verbrauchs-, bzw. Verschreibungsmengen von 2001 zu Grunde gelegt wurden, die Messungen aber schon in früheren Jahren durchgeführt wurden, als der Verbrauch von CBZ und EE2 geringer als 2001 war (vgl. Abb. 2.1 und Abb. 2.2). Das Modell der Phase I des Richtlinienentwurfs (EMEA, 2003a) resultierte in PECs mit den größten Abweichungen zu den durchschnittlich gemessenen Konzentrationen. Die so hergeleitete PEC_{OG-dt} für CBZ liegt ca. 10-mal höher als die durchschnittlich gemessene MEC_{OG-dt}. Dies beruht auf der für CBZ überhöhten Annahme des Faktors für den Markterfolg F_{pen} , der auf 1% festgesetzt wurde. Weltweit sind ca. 0,6-0,8% der Bevölkerung an einer Form der Epilepsie erkrankt (Offermanns & Rosenthal, 2004), wobei anzunehmen ist, dass nur ein Teil dieser Patienten dauerhaft mit CBZ behandelt wird.

Die PEC-Berechnung in Phase I des Richtlinienentwurfs (EMEA, 2003a) für SMX resultierte in eine Überschätzung der MEC_{OG-dt} um ca. zwei Größenordnungen. Die Ursache hierfür liegt sehr wahrscheinlich ebenfalls in der Standardannahme von $F_{pen} = 1\%$. Antibiotika werden

meist über einen begrenzten Zeitraum hinweg eingenommen, gewöhnlich für 7-10 Tage. Insofern ist die Annahme, dass 1% der Bevölkerung permanent über das ganze Jahr hinweg das Antibiotikum einnimmt, unrealistisch hoch.

Die MEC_{OG-dt} für EE2 steht im Einklang mit den mittels dem EMEA-Modell von 2001 und EUSES berechneten PECs (Tab. 3.3). Die anfängliche PEC-Berechnung des Richtlinienentwurfs nach EMEA (2003a) führt zu niedrigeren Konzentrationen als die gemessene MEC_{OG-dt} . Die in Einzelfällen maximal gemessenen EE2-Konzentrationen (Wenzel et al., 1998; Williams et al., 2003) liegen sogar bis um das 50-fache höher als die in Phase I des Richtlinienentwurfs berechnete PEC.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die anfängliche PEC-Abschätzung in Phase I des Richtlinienentwurfs (EMA, 2003a) von den hier untersuchten Modellen das am wenigsten geeignete ist. Zum einen überschätzt dieses Modell die Konzentrationen von CBZ und SMX bei weitem, zum anderen unterschätzt es die Konzentration von EE2 im Vergleich zu gemessenen Daten. Da die PEC-Abschätzung der Phase I der Umweltrisikobewertung der Entscheidungsfindung dient, ob die PEC den Schwellenwert von 10 ng/L überschreitet, könnte diese Berechnung ebenso mit dem Modell des Diskussionspapiers (EMA, 2001) durchgeführt werden, da dies bezüglich der Entscheidungsfindung zum gleichen Resultat führen würde. Zudem ist die maximale Tagesdosis in der anfänglichen PEC-Abschätzung des Richtlinienentwurfs (EMA, 2003a) die einzige veränderliche Variable, wodurch die PEC in direkter Korrelation zur Tagesdosis steht. Somit resultiert die PEC-Abschätzung für ein Arzneimittel bzw. einen Wirkstoff, der zu einer maximalen Tagesdosis von 2 mg verabreicht wird, in einer PEC von 10 ng/L. Alle Wirkstoffe, die in geringeren Dosen verabreicht werden, erreichen demzufolge den Schwellenwert nicht. Diese Berechnungsmethode hat zwar den Vorteil, dass für neue, noch nicht für den Markt zugelassene Pharmaka eine PEC-Abschätzung unabhängig von dem vorhergesagten oder tatsächlichen Verbrauch durchgeführt werden kann. Allerdings ist diese Methode nicht auf Arzneimittelprodukte anwendbar, für die eine maximale Tagesdosis im Sinne einer über einen bestimmten Zeitraum täglich verabreichte Menge nicht definierbar ist, wie z.B. Röntgenkontrastmittel.

Mit dem Vergleich von Literaturdaten und den Ergebnissen verschiedener Expositionsmodelle konnte gezeigt werden, dass für die ausgewählten Substanzen mit Hilfe des Modells nach EMA (EMA, 2001) stets höhere Konzentrationen als die durchschnittlichen MEC_{OG-dt} bestimmt wurden. Für die Durchführung einer verlässlichen Umweltrisikobewertung dürfen Umweltkonzentrationen keinesfalls unterschätzt werden. Somit zeigte sich das EMA-Modell von 2001 im Vergleich zu den anderen am geeignetsten für die Durchführung einer Expositionsabschätzung im Rahmen einer Umweltrisikobewertung. Berücksichtigt man allerdings die Tatsache, dass die Modellberechnung auf „worst-case“-Annahmen beruht, d.h. weder Metabolisierung im Menschen, noch Bioabbau in der Umwelt mit einkalkuliert werden, so ist es erstaunlich, wie gut die Übereinstimmung dieses Modells mit den gemessenen Umweltkonzentrationen ist. Abbau- oder Eliminationsprozesse werden in verfeinerten PEC-Abschätzungen auf höheren Stufen der Umweltrisikobewertung integriert. Dies führt gewöhn-

lich zu niedrigeren, aber auch realitätsnäheren PECs. Würde man allerdings für CBZ berücksichtigen, dass nur 1-3% der unmetabolisierten Ausgangssubstanz vom menschlichen Körper ausgeschieden werden (vgl. Kapitel 8.1.1 im Anhang), so führte dies zu im Vergleich zu gemessenen Umweltkonzentrationen zu deutlich niedrigeren PEC-Werten. Betrachtet man jedoch das Potenzial der Spaltung von CBZ-Konjugaten durch enzymatische und mikrobielle Aktivität in Kläranlagen und Oberflächengewässern, so würde dies wiederum erhöhte PEC-Werte anzeigen.

Es gibt eine Vielzahl von Faktoren, welche das Vorkommen von Substanzen während der Abwasserbehandlung oder nachfolgend in der (aquatischen) Umwelt beeinflussen können. Dies unterstützt die Forderung, dass eine anfängliche Expositionsabschätzung stets höhere PEC-Werte als die reale Umweltkonzentration ermitteln sollte, um eine verlässliche Umwelt-risikobewertung unter Vermeidung von falsch-negativen Aussagen durchführen zu können.

4 Risikocharakterisierung – Umweltrisikobewertung der ausgewählten PPCPs gemäß dem EMEA-Richtlinienentwurf

Die Umweltrisikobewertung besteht aus zwei Komponenten: Expositionsabschätzung (Kapitel 3) und Wirkungsabschätzung, bei der akute oder chronische Effektkonzentrationen der entsprechenden Substanz für repräsentative Organismen des betrachteten Kompartiments ermittelt werden. Aus diesen Effektkonzentrationen wird die maximale Konzentration, bei der keine Effekte in der Umwelt zu erwarten sind (PNEC) durch die Anwendung von sogenannten Extrapolations- oder Bewertungsfaktoren (BF) hergeleitet. Solche Faktoren sollen die Übertragung von im Labor mit einzelnen Arten erstellten Effektdaten auf die komplexe Situation in der realen Umwelt ermöglichen. Tab. 4.1 zeigt die im Richtlinienentwurf (EMA, 2003a) vorgeschlagenen Bewertungsfaktoren, die dem TGD (EC, 2003) zur Umweltrisikobewertung von Chemikalien und Biozide entsprechen. Je umfangreicher ein Datensatz und je besser die biologische Aussagekraft der gewählten Endpunkte der Untersuchungen ist, desto geringer wird im Allgemeinen der Unsicherheitsgrad und desto geringer der Bewertungsfaktor.

Die Bewertungsfaktoren berücksichtigen dabei die folgenden Sachverhalte:

- Extrapolation von akuter auf chronische Toxizität
- Unterschiedliche Empfindlichkeiten verschiedener Spezies
- Variabilität der Empfindlichkeit innerhalb einer Spezies
- Extrapolation von Labordaten auf tatsächliche Umweltbedingungen

Tab. 4.1: Bewertungsfaktoren zur Herleitung von aquatischen PNECs nach EMA (2003a).

Verfügbare Effektdaten	Bewertungsfaktor
Mindestens jeweils eine $L(E)C_{50}$ von jeder der drei trophischen Ebenen des Basisdatensatzes (Alge, Daphnie, Fisch)	1000
Eine Langzeit-NOEC für entweder Fisch oder Daphnie	100
Langzeit-NOECs für zwei Spezies aus zwei trophischen Ebenen (Fisch und/oder Daphnie und/oder Alge)	50
Langzeit-NOECs für mindestens drei Spezies aus drei trophischen Ebenen (normalerweise Alge, Daphnie, Fisch)	10

4.1 Phase I – PEC-Berechnung

Zunächst wurde gemäß der Phase I des Richtlinienentwurfs die anfängliche PEC, basierend auf der maximalen Tagesdosis der untersuchten Pharmaka, errechnet (vgl. Kap. 3.3). Dies resultierte in einer PEC für CBZ und SMX von 5 bzw. 10 µg/L und lag damit weit über dem Schwellenwert von 10 ng/L. Für EE2 wurde eine PEC von 0,13 ng/L ermittelt. Entsprechend dem Richtlinienentwurf (EMA, 2003a) wird damit ein vernachlässigbares, durch EE2 be-

dingtes Risiko für die Umwelt angezeigt. Auf Grund des endokrinen Potenzials von EE2 ist der Schwellenwert jedoch außer Kraft gesetzt, und ungeachtet der anfänglichen PEC wird die Umweltrisikobewertung für EE2 in der Phase II fortgeführt (vgl. Kap. 1.4.2). Da für den Moschusduftstoff AHTN keine definierte Tagesdosis anwendbar ist, konnte die anfängliche PEC nicht entsprechend dem Richtlinienentwurf (EMEA, 2003a) berechnet werden. Stattdessen wurde das Modell des Diskussionspapiers (EMEA, 2001) herangezogen, welches auf der Verbrauchsmenge der Substanz pro Jahr basiert. Dies ergab für AHTN eine PEC = 984 ng/L.

Tab. 4.2: Die in Phase II Stufe A des Richtlinienentwurfs (EMEA, 2003a) zu bestimmenden physikalischen und chemischen Kenngrößen sowie zu deren Messung empfohlene Richtlinien; gemessene Werte der untersuchten PPCPs.

Kenngröße	Richtlinie	CBZ	SMX	EE2	AHTN
UV-Absorptionsspektrum	OECD 101	n.v.	n.v.	geringe Absorption bei $\lambda = 320 \text{ nm}^1$	n.v.
Schmelzpunkt [°C]	OECD 102	190,2 ²	167 ³	180,3 ¹	55,5 ⁴
Wasserlöslichkeit [mg/L]	OECD 105	17,7 ²	610 ²	18,6 ¹	1,22 ⁵
Adsorptionskoeffizient (K_{oc})	OECD 106	3.871 ⁶	1.531 ⁶	47.660 ⁶ (log: 3,21-5,18 ¹⁵)	55.176 ⁷
Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient (log K_{ow})	OECD 107 (oder 117)	2,45 ²	0,89 ²	4,2 ¹	5,7 ⁷
Dissoziationskonstante (pK_a)	OECD 112	n.v.	5,6 ⁸	10,46 ¹	n.v.
Aerobische und anaerobische Wasser/Sediment-Transformation	OECD 308	DT _{50 Total} > 365 d; nach 100 d ca. 40% im Sediment nachgewiesen ⁹	n.v.	n.v.	n.v.
Dampfdruck [Pa]	OECD 104 (optional)	1,17E-05 ⁶	9,24E-06 ²	2E-05 ¹⁰	0,0608 ⁷
Hydrolyse (in Abhängigkeit des pH)	OECD 111 (optional)	vernachlässigbar ⁶	n.v.	vernachlässigbar ¹	n.v.
Bioabbaubarkeit	OECD 301 (optional)	nicht bioabbaubar ¹¹	nicht bioabbaubar ¹²	nicht bioabbaubar ¹	potenziell bioabbaubar ⁷
Photolyse ($t_{1/2}$)	z.B. OECD Monograph No.61 (optional)	> 100 d ¹³	2,4 d ¹³	> 10 d ¹⁴	n.v.

¹: Schweinfurth et al., 1997; ²: SRC PhysProp Database, 2003 (www.esc.syrres.com); ³: Chemical Health & Safety Database, National Toxicology Programme (USA), 2003 (<http://ntp-server.niehs.nih.gov>); ⁴: EG-Sicherheitsdatenblatt, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Deutschland; ⁵: Balk & Ford, 1999a; ⁶: U.S.EPA, 2000; ⁷: van de Plassche & Balk, 1997; ⁸: Merck-Index, 1999; ⁹: Löffler et al., eingereicht 10/2004; ¹⁰: Christensen, 1998; ¹¹: Hartmann et al., 2002; ¹²: Al-Ahmad et al., 1999; ¹³: Andreozzi et al., 2003; ¹⁴: Jürgens et al., 2002; DT: *disappearance time*; n.v.: nicht verfügbar; ¹⁵: Yu et al., 2004.

4.2 Phase II Stufe A – Fate-Studien

In Stufe A der Phase II soll zunächst ein Basisdatensatz zu Verbleib und Verhalten der Substanzen in der Umwelt (*fate*-Studien) gemäß standardisierten OECD-Richtlinien ermittelt werden (vgl. Kap. 1.4.2). Die meisten der zu bestimmenden physikalischen und chemischen Eigenschaften waren für die ausgewählten Substanzen in der Literatur verfügbar (Tab. 4.2).

Verschiedene Parameter zum Verbleib oder Abbauverhalten der Substanzen in der Umwelt können zur Verfeinerung der PEC-Abschätzung herangezogen werden. Eine verfeinerte PEC-Berechnung nach dem Schema der Phase II Stufe B des Richtlinienentwurfs wurde allerdings nicht durchgeführt, da zu diesem Zweck gemessene Daten in Oberflächengewässern herangezogen wurden.

4.3 Phase II Stufe A – erste quantitative Risikocharakterisierung

Zur Herleitung der PNECs für die ausgewählten Substanzen wurde aus dem durch eigene Studien und der durchgeführten Literaturrecherche gewonnen Datensatz die jeweils in Kurzzeit- und Langzeitstudien niedrigsten Effektkonzentrationen ausgewählt (vgl. Tab. 2.51). Aus diesen Effektdaten wurde durch Division mit den entsprechenden Bewertungsfaktoren für jede Substanz die in zwei Stufen PNEC berechnet (Tab. 4.3 und Tab. 4.4).

Zunächst wurden gemäß den Anforderungen der Phase II Stufe A die verfügbaren Kurzzeitdaten zur Herleitung der PNEC verwendet. Dabei wurde ein Bewertungsfaktor von 1000 auf die niedrigste L(E)C₅₀ des jeweils empfindlichsten Organismus angewendet (Tab. 4.3). Die zu erwartende Umweltkonzentration in Oberflächengewässern (PEC) basierte in dieser Phase der Risikoabschätzung auf der erstmals verfeinerten PEC unter Berücksichtigung der zu erwartenden Verordnungsmenge pro Jahr, bzw. im Fall der hier untersuchten Substanzen auf die bekannte Verordnungsmenge des Jahres 2001 (vgl. Kap. 3.3).

Tab. 4.3: Risikocharakterisierung – Phase II Stufe A: Empfindlichste Organismen und Effektkonzentrationen in Kurzzeitstudien (LC₅₀ oder EC₅₀) mit den ausgewählten Substanzen, daraus abgeleitete PNECs unter Verwendung des entsprechenden Bewertungsfaktors (BF), und Ergebnisse der Risikocharakterisierung (PEC/PNEC).

Substanz	Empfindlichster Testorganismus	L(E)C ₅₀ [mg/L]	BF	PNEC [µg/L]	PEC ¹ [µg/L]	PEC/PNEC
CBZ	<i>D. magna</i>	13,8 ²	1000	13,8	1,46	0,11
SMX	<i>S. subspicatus</i>	3,2 ³	1000	3,2	0,895	0,28
EE2	<i>S. subspicatus</i>	0,84 ⁴	1000	0,84	0,00079	0,0009
AHTN	<i>P. subcapitata</i>	0,468 ⁵	1000	0,468	0,984 ⁶	2,1

¹: abgeschätzte zu erwartende Umweltkonzentration in Oberflächengewässer gemäß Richtlinienentwurf (EMEA, 2003a) Phase II Stufe A (vgl. Kap. 3.3); ²: Ferrari et al. (2003); eigene Studie; ⁴: Kopf (1997); ⁵: van de Plasche & Balk (1997); ⁶: PEC entsprechend dem EMEA-Diskussionspapier berechnet (EMEA, 2001)

Diese erste, auf Kurzzeit-Effektdaten und grob abgeschätzten Umweltkonzentrationen beruhende Risikoabschätzung ergab ein nicht vertretbares Risiko für die aquatische Umwelt durch den Moschusduftstoff AHTN (PEC/PNEC > 1). Für die untersuchten Arzneimittelwirkstoffe resultierte dieses Verfahren in ein PEC/PNEC-Verhältnis < 1, welches ein niedriges Risiko für die aquatische Umwelt anzeigt; für diese Substanzen könnte daher die Umweltrisikobe-

wertung nach dem im Richtlinienentwurf (EMA, 2003a) vorgeschlagenen Bewertungskonzept beendet werden.

In einem nicht standardisierten Wachstuminhibitionstest mit der Blaualge *Synechococcus leopoliensis* wurde für SMX eine $EC_{50/96\text{ h}}$ von 26,8 µg/L bestimmt (Ferrari et al., 2004). In diesem Test wurde entgegen den Anforderungen standardisierter Richtlinien für Algentests (z.B. OECD, 1984a) anstatt Dauerlicht eine 16:8 h hell-dunkel Lichtperiode als Testbedingung gewählt. Zudem fand die Auswertung der Wachstuminhibition nur zu Testende nach 96 h Expositionsdauer und nicht im 24 h-Rhythmus statt. Gemäß den Vorgaben des EMA-Richtlinienentwurfs (EMA, 2003) wäre dieses Testergebnis somit nur bedingt für eine Risikoabschätzung zu verwenden, jedoch gibt das Ergebnis ausreichend Anlass, eine Umweltisikoabschätzung auf der höheren Stufe in Phase II Stufe B fortzuführen.

4.4 Phase II Stufe B – verfeinerte Risikocharakterisierung

Unabhängig von den Ergebnissen der auf Kurzzeit-Effektdaten beruhenden Risikoabschätzungen wurde in einem zweiten Schritt gemäß der Phase II Stufe B des Richtlinienentwurfs (EMA, 2003a) die vorhandenen Langzeit-Effektdaten als Grundlage zur PNEC-Berechnung herangezogen (Tab. 4.4). Die anzuwendenden Bewertungsfaktoren wurden gemäß EMA (2003a) angepasst. Als zu erwartende Umweltkonzentrationen (PEC) wurden die aus gemessenen Daten abgeleiteten durchschnittlichen Konzentrationen für Oberflächengewässer herangezogen (vgl. Kap. 3.3). Somit wurde sowohl die Wirkungsabschätzung, als auch die Expositionsabschätzung verfeinert. Anders als in der auf Kurzzeit-Effektdaten basierenden Risikocharakterisierung ergab sich ein geringes Risiko durch CBZ und AHTN für die aquatische Umwelt, jedoch ein nicht vertretbares Risiko durch SMX und EE2 (Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Risikocharakterisierung – Phase II Stufe B: Empfindlichste Organismen und deren NOECs in Langzeitstudien für die ausgewählten Substanzen und daraus abgeleitete PNECs unter Verwendung der entsprechenden Bewertungsfaktoren (BF) und Ergebnisse der Risikocharakterisierung (PEC/PNEC).

Substanz	Testorganismus	NOEC [µg/L]	BF	PNEC [µg/L]	PEC ¹ [µg/L]	PEC/ PNEC
CBZ	<i>C. dubia</i>	25 ²	10	2,5	0,517	0,2
SMX	<i>L. gibba</i>	10 ³	100	0,1	0,140	1,7
EE2	<i>D. rerio</i> (Mortalität)	0,01 ⁴	10	0,001	0,00063	0,63
	<i>D. rerio</i> (Befruchtung)	0,0003 ⁴		0,00003		21
AHTN	<i>P. promelas</i>	35 ⁵	10	3,5	0,311	0,09

¹: durchschnittliche in Oberflächengewässern gemessene Konzentrationen (90. Perzentile) (vgl. Kap. 3.3);

²: Ferrari et al., 2003; ³: Brain et al., 2004; ⁴: Wenzel et al., 1999; ⁵: van de Plassche & Balk, 1997.

Bei der Risikoabschätzung für AHTN führte die verfeinerte Effekt- und Expositionsabschätzung der Stufe B in Phase II dazu, dass das zunächst auf Akutdaten beruhende erhöhte Um-

weltrisiko entkräftet wurde und die Umweltrisikobewertung beendet werden könnte. Für die Substanzen SMX und EE2 wurde durch das auf Kurzzeitstudien basierende PEC/PNEC-Verhältnis ein vernachlässigbares Risiko für die aquatische Umwelt indiziert ($PEC/PNEC < 1$). Mit verfeinerten Expositions- und auf Langzeitstudien basierenden Effektdaten wurde jedoch ein nicht vertretbares Risiko durch SMX und EE2 für die aquatische Umwelt erkannt ($PEC/PNEC > 1$). Diese Beispiele verdeutlichen, dass eine ausschließlich auf Kurzzeitdaten basierende Risikoabschätzung zu falsch-negativen Aussagen gelangen kann.

4.5 Phase II Stufe B – weiterführende Effektstudien

Die Ergebnisse mancher *fate*-Studien aus Phase II Stufe A erfordern gemäß dem Richtlinienentwurf bei Erreichen von bestimmten Schwellenwerten die Durchführung von spezifischen Untersuchungen in Phase II Stufe B. Demnach soll für Substanzen mit einem $\log K_{ow} \geq 3$ eine Fisch-Biokonzentrationsstudie entsprechend der OECD-Richtlinie 305 (OECD, 1996) durchgeführt werden. Des Weiteren soll zur Bewertung des Risikos durch Bioakkumulation und Biomagnifikation gemäß den Angaben im TGD vorgegangen werden. Für Substanzen mit einem $\log K_{oc} \geq 4$ soll ein Basisdatensatz für das terrestrische Kompartiment erstellt werden. Falls im Test der „aeroben und anaeroben Transformation in aquatischen Wasser/Sediment-Systemen“ (OECD, 2002b) eine „extensive Verlagerung“ der Substanz von der Wasserphase in das Sediment festgestellt wird, soll eine Bewertung der Toxizität gegenüber sedimentbewohnenden Organismen entsprechend der im TGD vorgeschlagenen Strategien durchgeführt werden. Ergebnisse entsprechender *fate*-Studien waren zum Teil aus der Literatur verfügbar (Tab. 4.2).

4.5.1 Toxizität gegenüber sedimentbewohnenden Organismen

CBZ wurde in einer Wasser/Sediment-Transformationsstudie, die in Anlehnung an die OECD-Richtlinie 308 (OECD, 2002b) durchgeführt wurde, mit einer $DT_{50} > 365$ d als sehr persistent klassifiziert (Löffler et al., eingereicht 10/2004). Nach 100 d Inkubationszeit wurden noch ca. 83% der Ausgangssubstanz im gesamten Wasser/Sediment-System nachgewiesen, wobei ca. 40% der ursprünglich in die Wasserphase dotierten Substanz im Sediment vorlagen. Dies wird in Anbetracht der hohen Persistenz der Substanz als „extensive Verlagerung“ in das Sediment gewertet, was gemäß dem Richtlinienentwurf die Bewertung der Toxizität gegenüber sedimentbewohnenden Organismen erfordert.

Für CBZ liegen zwei Langzeit-Sediment-Toxizitätsstudien vor (Oetken et al., eingereicht; vgl. Tab. 8.6 im Anhang). Der empfindlichere Organismus war die Zuckmückenlarve *Chironomus riparius* für den bezüglich des Endpunktes Schlupfrate eine $NOEC < 0,14$ mg/kg TG Sediment, basierend auf gemessenen Konzentrationen ermittelt wurde. Unter Anwendung eines Bewertungsfaktors von 50 gemäß TGD ergibt sich daraus eine $PNEC_{Sediment} < 2,8$ µg/kg TG (Tab. 4.5).

In natürlichen Sedimenten gemessene CBZ-Konzentrationen liegen nicht vor. Deshalb wurde die Konzentration von CBZ im Sediment basierend auf dem K_{oc} (s. Tab. 4.2) und der gemessenen Konzentration in Oberflächengewässer (s. Tab. 4.4) nach der im TGD (EC, 2003) beschriebenen Methode abgeschätzt (s. TGD, Teil II, Abschnitt 2.3.8.4). Diese Methode berücksichtigt definierte Standardwerte für verschiedene Parameter der Umweltkompartimente wie die Dichte von Fest- und Schwebstoffen und den Anteil des Wassers in Schwebstoffen. Danach ergibt sich basierend, auf der $PEC_{Wasser} = 517 \text{ ng/L}$ eine $PEC_{Sediment}$ von $43,9 \text{ µg/kg TG Sediment}$. Das $PEC/PNEC$ -Verhältnis für das Kompartiment Sediment liegt für CBZ bei 15,7 und zeigt somit ein nicht vertretbares Umweltrisiko auf (Tab. 4.5).

Tab. 4.5: NOECs aus Langzeitstudien mit sedimentbewohnenden Organismen (vgl. Tab. 8.6-8.9 im Anhang), daraus abgeleitete PNECs, berechnete und gemessene PECs und entsprechende $PEC/PNEC$ -Verhältnisse für CBZ, EE2 und AHTN.

Substanz	NOEC	BF ¹	$PNEC_{Sediment}$	$PEC_{Sediment}$	$PEC/PNEC$
CBZ	$< 0,14 \text{ mg/kg TG}^2$	50	$< 2,8 \text{ µg/kg TG}$	$43,9 \text{ µg/kg TG}^3$	15,7
EE2	$31,6 \text{ mg/kg TG}^4$	100	316 µg/kg TG	$0,9 \text{ µg/kg TG}^5$	0,003
AHTN	50 mg/kg TG^4	100	500 µg/kg TG	480 µg/kg TG^6	0,96

¹: Bewertungsfaktor (BF) gemäß TGD (EC, 2003); ²: Oetken et al. (eingereicht); ³: berechnet basierend auf PEC_{Wasser} und K_{oc} ; ⁴: eigene durchgeführte Studien mit *L. variegatus*; ⁵: gemessener Wert (Ternes et al., 2002); ⁶: von in Schwebstoffen gemessene Konzentration abgeleitet (van de Plassche & Balk, 1997)

Für SMX, EE2 und AHTN waren keine Ergebnisse zum Verhalten der Substanzen im Wasser-Sediment-System entsprechend der OECD-Richtlinie 308 verfügbar. Das TGD sieht jedoch für Substanzen mit einem $\log K_{ow} \geq 3$ (EE2 und AHTN) die Bewertung der Toxizität gegenüber sedimentbewohnenden Organismen vor.

Die in der mit EE2 durchgeführte Sediment-Toxizitätsstudie resultierte in einer $NOEC = 31,6 \text{ mg/kg TG}$. Die Anwendung eines Bewertungsfaktors (BF) von 100 führt zu einer $PNEC = 316 \text{ µg/kg TG Sediment}$. Ternes et al. (2002) analysierten natürliche Flusssedimente und ermittelten eine Maximalkonzentration von $0,9 \text{ µg EE2/kg TG Sediment}$. Auf Grund der wenigen gemessenen Umweltkonzentrationen in Sedimenten wird diese Konzentration als PEC herangezogen. Die Risikocharakterisierung resultiert in einem $PEC/PNEC$ -Verhältnis von 0,003, wodurch ein vernachlässigbares Risiko für das Kompartiment 'aquatische Sedimente' aufgezeigt wird (Tab. 4.5).

Daten über die Belastung von natürlichen Sedimenten mit AHTN sind wenig in der wissenschaftlichen Literatur verfügbar. Rimkus (1999) zitiert eine gemessene Umweltkonzentration im Sediment von $3,9 \text{ µg/kg TG Sediment}$ aus der Leine. Winkler et al. (1998) bestimmten die Konzentration von AHTN in Schwebstoffen der Elbe auf 770 µg/kg TG . Die Schwebstoffe sind auf Grund ihrer Ablagerung den Sedimenten annähernd vergleichbar. In der von van de Plassche & Balk (1997) durchgeführten Umweltrisikobewertung wird die Konzentration von AHTN im Sediment in einer „worst-case-Berechnung“, die auf Messungen der Konzentration in Schwebstoffen beruht, mit 480 µg/kg TG angegeben. Das daraus abgeleitete

PEC/PNEC-Verhältnis liegt mit 0,96 knapp unterhalb von 1 und zeigt somit ein eher niedriges Risiko für aquatische Sedimente auf (Tab. 4.5).

4.5.2 Biokonzentration

Nach dem Bewertungsschema des Richtlinienentwurfs (EMEA, 2003a) sind für EE2 und AHTN ($\log K_{ow} > 3$) in Phase II Stufe B Fisch-Biokonzentrationsstudien erforderlich. Für Substanzen mit einem $\log K_{ow} > 4,5$ wird angenommen, dass der Aufnahmeweg über kontaminierte Nahrung oder das Sediment an Bedeutung zunimmt und somit das Potenzial für *secondary poisoning* steigt (EC, 2003). Für diese Substanzen, die zum einen akkumulierende Eigenschaften aufweisen, und von denen zum anderen bekannt ist, dass sie ein großes toxisches Potenzial besitzen, soll entsprechend dem TGD eine Bewertung des *secondary poisoning* durchgeführt werden. Die zu diesem Zwecke angenommene Standard-Nahrungskette Wasser → aquatische Organismen (Produzenten, Primärkonsumenten) → Fisch (Primär- und Sekundärkonsumenten) → fischfressende Säuger und Vögel zielt auf die Bewertung der Auswirkungen auf am Ende einer Nahrungskette und nur indirekt exponierten Organismen. Bei Substanzen mit spezifischen toxischen Eigenschaften, wie z.B. endokrinem Potenzial, soll *secondary poisoning* unabhängig von der Toxizität dieser Substanzen gegenüber Säuger bewertet werden. Nach diesen Regeln müsste im weiteren Verfahren der Risikobewertung gemäß dem Richtlinienentwurf (EMEA, 2003a) für EE2 eine Bewertung des *secondary poisonings* gemäß dem TGD vorgenommen werden, da zum einen ein Akkumulationspotenzial vorhanden ($\log K_{ow} > 3$) und zum anderen ein großes endokrines Potenzial bekannt ist.

Für AHTN wurde ein BCF von 597 bestimmt (van de Plassche & Balk, 1997), im wild gefangenen Aal wurden sogar doppelt so hohe Anreicherungswerte von 1.069 (Fromme et al., 2001; Tab. 4.6) gemessen. Diese Werte und der hohe $\log K_{ow} = 5,7$ zeigen ein großes Bioakkumulationspotenzial von AHTN auf, weshalb im Rahmen der von van de Plassche & Balk (1997) durchgeführten Umweltrisikobewertung, basierend auf der Säuger-Toxizität (Langzeit-Studie mit Ratten, Hopkins et al., 1996), eine Abschätzung des *secondary poisonings* vorgenommen wurde. Dieser wurde die maximal gemessene Konzentration in Fischen von 0,146 mg/kg FG und eine $PNEC_{oral}$ für Prädatoren von 10 mg/kg Nahrung zu Grunde gelegt (Bewertungsfaktor: 30), was in einem PEC/PNEC-Verhältnis von 0,015 resultierte. Demzufolge wurde das Risiko für fischfressende Konsumenten als unbedenklich eingestuft.

Die Bewertung des *secondary poisonings* entsprechend den Vorgaben des TGD wird ausschließlich an der oben beschriebenen Standard-Nahrungskette Wasser → Fisch → Fischfresser vorgenommen. Die Möglichkeit des *secondary poisonings* bei Fischen verursacht durch die Aufnahme von in der Nahrung angereicherter Substanz mittels Bioakkumulation und/oder Biomagnifikation findet bei dem Bewertungsschema entsprechend dem TGD keine Berücksichtigung. Auf Grund des hohen endokrinen Potenzials von EE2 und der hohen in der Sediment-Bioakkumulationsstudie gemessenen Akkumulationsfaktoren für EE2 bei *L. variegatus* (vgl. Kap. 2.2.4) soll im Folgenden die Möglichkeit des *secondary poisonings* bei wurmfres-

senden Fischen über die Nahrungskette Wasser → Sediment → Wurm → Fisch betrachtet werden.

Tab. 4.6: Biokonzentrations- (BCF) und Akkumulationsfaktoren (AF) gemessen für EE2 und AHTN (vgl. Tab. 8.8 und 8.9 im Anhang).

Parameter	EE2	AHTN
Biokonzentration (Fisch)		
berechnet ¹ : BCF = 741		BCF = 13.964
<i>Pimephales promelas</i> : BCF = 610-660 (Gesamtradioaktivität) ²		-
<i>Lepomis macrochirus</i> : -		BCF _(FG) = 1.320 (Gesamtradioaktivität)
		BCF _(FG) = 597 (Ursubstanz) ³
<i>Anguilla anguilla</i> : -		BCF _(FG) = 1.069 (Wildfang)
		BCF _(Lipid) = 5.017 (Wildfang) ⁴
Biokonzentration (Wurm)		
<i>L. variegatus</i> (Wasser): -		BCF _(FG) = 6.918 ⁵
Bioakkumulation (Wurm)		
<i>L. variegatus</i> (Sediment): AF _(FG) = 90 (Gesamtradioaktivität) ⁶		-
	AF _(Lipid) = 75 (Gesamtradioaktivität) ⁶	

¹: berechnet nach linearem Modell basierend auf dem K_{ow} für Substanzen mit log K_{ow} < 6 gemäß TGD (EC, 2003); ²: Länge et al. (2001); ³: van de Plassche & Balk (1997); ⁴: Fromme et al. (2001); ⁵: Artola-Garicano et al. (2003); ⁶: eigene Studie; FG: normiert auf Frischgewicht; Lipid: normiert auf Lipidgehalt

Secondary Poisoning durch EE2: Bioakkumulation in L. variegatus und Biokonzentration bei Fischen

Aus dem im Labor bestimmten Anreicherungsfaktor für *L. variegatus* und der von Ternes et al. (2002) in Flusssedimenten gemessenen maximalen EE2-Konzentration von 0,9 ng/g TG Sediment lässt sich die EE2-Belastung bei Würmern in natürlichen Ökosystemen abschätzen. Setzt man als Umweltbedingungen die gleichen Sediment- und Wurmeigenschaften voraus, wie sie in der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sediment-Bioakkumulationsstudie (Kap. 2.1.9) gemessen wurden (Sediment: 2,4% TOC; Würmer: 19% Trockenmasse, 8% Lipidgehalt), dann würde sich bei der von Ternes et al. (2002) gemessenen EE2-Konzentration im Sediment und dem lipid-normalisierten Anreicherungsfaktor von 75 eine Körperkonzentration („body burden“) von 2,8 µg EE2/g Lipid in den Würmern einstellen. Dies entspricht einer Konzentration von 43 ng EE2/g FG oder 226 ng EE2/g TG Wurm (Tab. 4.7), die bei den Würmern selbst keine Auswirkungen erwarten lässt, wie in dem Sediment-Toxizitätstest mit EE2 gezeigt werden konnte (vgl. Kap. 2.2.3).

In einer „Life-Cycle“-Studie mit der Dickkopfelritze (*Pimephales promelas*) wurde eine NOEC = 1 ng/L und BCFs von 610 bzw. 660 in zwei unterschiedlichen EE2-Konzentrationen und bei Fischen während unterschiedlicher Lebensstadien bestimmt (Länge et al., 2001; vgl. Tab. 8.8). Daraus lässt sich die „kritische Körperbelastung“ („critical body burden“ CBB) errechnen, indem man die NOEC mit dem BCF multipliziert (durchschnittlicher BCF = 635). Die CBB ist die Schwellenkonzentration der Substanz im Organismus, ab welcher Effekte zu erwarten sind. Für *P. promelas* lässt sich somit eine CBB von 635 ng EE2/kg FG Fisch herleiten. Vergleicht man diese CBB mit der oben berechneten EE2-Körperkonzentration in Wür-

mern unter umweltrelevanten Expositionsbedingungen, so ergibt sich daraus, dass ein Fisch mit 1 kg Körpergewicht mindestens 14,8 g Würmer konsumieren müsste, um die CBB zu erreichen (Tab. 4.7). Diese Menge entspräche somit der „*acceptable intake*“, also der maximalen Substanzmenge in kontaminierter Nahrung, welche vom Organismus aufgenommen werden kann, ohne ökologische und gesundheitliche Auswirkungen hervorzurufen. Demnach müsste also eine Dickkopfelritze ca. 1,5% ihres Körpergewichts an kontaminierten Würmern zu sich nehmen, um die EE2-Konzentration der CBB zu erreichen. Diese Menge liegt etwa im Bereich der im „*Juvenile Growth Test* – OECD 215“ (OECD, 2000a) für Forellen empfohlenen täglichen Fütterungsrate für Trockenfutter von 4% des Körpergewichts. Somit ist anzunehmen, dass bei einer Dickkopfelritze bei der beschriebenen Wurmdiat innerhalb weniger Tage durch mittels der Nahrung aufgenommenes EE2 verursachte Effekte auftreten sollten.

Tab. 4.7: „*Acceptable intake*“ von EE2 für *Pimephales promelas*, basierend auf für *Lumbriculus variegatus* gemessenen Akkumulationsfaktor (AF) und für *Pimephales promelas* gemessene BCF, LOEC und NOEC.

PEC _{Sediment} ¹	Wurm (<i>L. variegatus</i>)		Fisch (<i>P. promelas</i>)				Fisch- <i>acceptable intake</i>
	AF _{Lipid} ²	Body burden	BCF ³	LOEC ³	NOEC ³	CBB	
0,9 ng/g TG	75	43 ng/g FG	635	4 ng/L	1 ng/L	> 635 ng/kg FG	14,8 g Wurm FG/kg Fisch

¹: Ternes et al. (2002); ²: eigene Studie; ³: Länge et al. (2001)

Dieses Rechenbeispiel veranschaulicht, dass ein Transfer des Steroidhormons 17 α -Ethinylostradiol aus belasteten Sedimenten über benthische Organismen zu höheren trophischen Ebenen und daraus folgend *secondary poisoning* möglich ist. Die dabei verwendeten Daten sind jedoch aus verschiedenen Gründen kritisch zu betrachten: Die von Länge et al. (2001) bestimmten Biokonzentrationsfaktoren für *P. promelas* wurden für Fische abgeleitet, die bei der gewählten EE2-Konzentration toxische Effekte aufwiesen. Auf Grund der durch die Analysemethoden gegebenen Bestimmungsgrenzen konnten bei niedrigeren Konzentrationen keine BCFs bestimmt werden. Die Autoren vermuteten, dass der BCF bei gesunden Fischen wahrscheinlich < 500 liegt. Bei einem niedrigeren BCF als der im obigen Rechenbeispiel verwendete wäre allerdings die CBB ebenfalls geringer. Dies würde dazu führen, dass in *P. promelas* die kritische Körperkonzentration bereits nach dem Konsum einer kleineren Menge Würmer erreicht würde.

Das Rechenbeispiel veranschaulicht einen „*worst case*“, da die CBB basierend auf der NOEC errechnet wurde. Nicht berücksichtigt wurden im Fisch ablaufende metabolische Prozesse wie Absorptionsrate der Substanz aus der Nahrung, eventuell eintretende Metabolisierung der Substanz und gleichzeitig zur Aufnahme ablaufende Ausscheidungsprozesse. Allerdings bleibt anzumerken, dass der Akkumulationsfaktor für *L. variegatus* nicht im *steady state* gemessen, sondern aus einer linear ansteigenden Akkumulationskinetik ermittelt wurde. Unter natürlichen Bedingungen könnte deshalb der Bioakkumulationsfaktor für *L. variegatus* durchaus höher, und somit die Belastung der Würmer größer sein.

Fütterungsversuche am Zebraäbrbling (*Danio rerio*) zeigten, dass orale Exposition gegenüber EE2 zu endokrinen Effekten wie Vitellogenininduktion und Verringerung der Eiproduktion führt (Valle et al., 2001). Die bei diesen Versuchen eingesetzte EE2-Konzentration im Futter lag ca. 88-mal höher als die für umweltrelevante Expositionsbedingungen berechnete EE2-Konzentration in Würmern („body burden“, vgl. Tab. 4.7). In ähnlichen Fütterungsversuchen mit Medaka (*Oryzias latipes*) wurde bei EE2-Konzentrationen im Futter, welche der oben berechneten *body burden* der Würmer entsprach, nach einer 7-tägigen Exposition eine signifikante Vitellogenininduktion in adulten männlichen Fischen festgestellt (Chikae et al., 2004). Bei einer Studie über die Aufnahmewege des endokrin wirksamen 4-*tert*-Nonyl-phenols bei *P. promelas* wurde gezeigt, dass über die Wasserphase exponierte Fische eine 10-fach größere Empfindlichkeit gegenüber der Prüfsubstanz besaßen als solche, die die Substanz über die Nahrung aufnahmen (Pickford et al., 2003). Diese Untersuchungen zeigen, dass die orale Exposition gegenüber endokrinen Disruptoren durchaus von Bedeutung ist. Über den Stellenwert des oralen Expositionsweges lässt sich allerdings keine allgemeingültige Aussage machen, da der von der Wasserphase über die Haut und Kiemen aufgenommene Anteil einer Substanz im Verhältnis zum über kontaminierte Nahrung oral aufgenommenen Anteil sich je nach Spezies und Substanz unterscheiden kann.

Um mittels Bioakkumulations- und Biokonzentrationsdaten eine Aussage zum *secondary poisoning* treffen zu können, sollten genauere Informationen zur Lebens- und Ernährungsweise des betreffenden Organismus berücksichtigt werden bzw. müsste der Anteil an Würmern an der Nahrung bekannt sein. *P. promelas* ist ein in Nordamerika beheimateter Süßwasserfisch, der in vielfältigen Lebensräumen vorkommt. Seine Nahrung besteht unter anderem aus kleinen Crustaceen und anderen Invertebraten, die er bevorzugt in Habitaten mit weichen Böden und Sedimenten erbeutet, aber auch aus Insekten, Algen und anderen Pflanzen (Becker, 1983; Sublette et al., 1990; zitiert bei: <http://www.natureserve.org>). In dem oben durchgeführten Rechenbeispiel wurde in einem *worst case*-Szenarium angenommen, dass sich der Fisch ausschließlich von Würmern ernährt.

4.5.3 Toxizität gegenüber terrestrischen Organismen

Die Adsorptionskoeffizienten (K_{oc}) von EE2 und AHTN liegen beide oberhalb des Schwellenwertes von 10.000 ($\log K_{oc} > 4$), weshalb entsprechend dem Richtlinienentwurf eine Bewertung der Toxizität gegenüber terrestrischen Organismen durchgeführt werden soll. Der geforderte Basisdatensatz besteht aus Untersuchungen:

- zur aeroben und anaeroben Transformation in Boden (OECD 307),
- zur Aktivität der N-Transformation von bodenlebenden Mikroorganismen (OECD 216),
- zum Wachstum terrestrischer höherer Pflanzen (OECD 208),
- zur akuten Regenwurm-Toxizität (OECD 207), und
- zur Reproduktion von Collembolen (ISO 11267).

In der wissenschaftlichen Literatur konnten für EE2 keine entsprechenden Daten gefunden werden.

Für AHTN waren Ergebnisse chronischer Toxizitätstests mit dem Regenwurm *Eisenia fetida* und dem Springschwanz *Folsomia candida* verfügbar, die in der nach dem TGD (EC, 1996) durchgeführten Umweltrisikobewertung Verwendung fanden (van de Plassche & Balk, 1997) (vgl. Tab. 8.9). Aus der für *F. candida* ermittelten NOEC wurde von den Autoren unter Anwendung eines Konvertierungsfaktors von 2,8 für den organischen C-Gehalt eines Standard-Bodens und einem Bewertungsfaktor von 50 eine $PNEC_{\text{Boden}} = 0,32 \text{ mg/kg TG}$ hergeleitet. Das Verhältnis der mittels EUSES errechneten $PEC_{\text{Boden}} = 0,26 \text{ mg/kg TG}$ zur PNEC ergab 0,81 (Tab. 4.8). Das von AHTN ausgehende Umweltrisiko für bodenlebende Organismen wurde dementsprechend als vertretbar eingestuft.

Tab. 4.8: Risikocharakterisierung für AHTN basierend auf der chronischen Toxizität gegenüber *Folsomia candida* (van de Plassche & Balk, 1997).

Substanz	NOEC	KF ¹	BF ²	$PNEC_{\text{Boden}}$	PEC_{Boden}	PEC/PNEC
AHTN	45 mg/kg TG	2,8	50	0,32 mg/kg TG	0,26 mg/kg TG	0,81

¹: Konvertierungsfaktor für Normalisierung auf C-Gehalt eines Standard-Bodens gemäß TGD (EC, 1996)

²: Bewertungsfaktor gemäß TGD (EC, 1996)

4.5.4 PBT- und vPvB-Substanzen

Der Richtlinienentwurf (EMEA, 2003a) sieht die Identifizierung von sogenannten PBT- („persistent, bioaccumulative, toxic“) und vPvB-Substanzen („very persistent, very bioaccumulative“) vor. Die Kriterien zur Identifizierung und der Bewertung solcher Substanzen sind dem TGD zu entnehmen (Tab. 4.9).

Tab. 4.9: Kriterien zur Identifizierung von PBT- und vPvB-Substanzen nach TGD (EC, 2003).

Kriterium	PBT-Kriterien	vPvB-Kriterien
P	$t_{1/2} > 60 \text{ d}$ in marinem Wasser oder $> 40 \text{ d}$ in Süßwasser oder $t_{1/2} > 180 \text{ d}$ in marinem Sediment oder $> 120 \text{ d}$ in Süßwassersediment	$t_{1/2} > 60 \text{ d}$ in marinem Wasser oder Süßwasser oder $t_{1/2} > 180 \text{ d}$ in marinem oder Süßwassersediment
B	$BCF_{(FG)} > 2.000$	$BCF_{(FG)} > 5.000$
T	Langzeit NOEC $< 0,01 \text{ mg/L}$ oder CMR ¹ oder endokrine Wirksamkeit	n.a.

¹: CMR: kanzerogen, mutagen oder reproduktionstoxisch; $t_{1/2}$: Halbwertszeit; FG: normiert auf Frischgewicht; n.a.: nicht anwendbar

Die Persistenz (P) einer Substanz wird mittels der Ergebnisse der Wasser/Sediment-Transformationsstudie (OECD 308) beurteilt. Die Beurteilung der Bioakkumulierbarkeit (B) orientiert sich an dem BCF, der für Substanzen mit einem $\log K_{ow} > 3$ ermittelt werden soll. Liegt kein gemessener BCF vor, so wird von Substanzen mit einem $\log K_{ow} > 4,5$ angenommen, dass das B-Kriterium erfüllt ist. Die Toxizität (T-Kriterium) einer Substanz wird mittels chronischer Effektdaten beurteilt, wobei eine NOEC $< 10 \mu\text{g/L}$ als Schwellenwert definiert

ist. Falls Informationen zur Kanzerogenität, Mutagenität oder Reproduktionstoxizität einer Substanz vorliegen oder die endokrine Wirksamkeit dieser bekannt ist, so wird das T-Kriterium als erfüllt angesehen. Für Substanzen, die nach den in Tab. 4.9 genannten Kriterien als sehr persistent (vP) und sehr bioakkumulativ (vB) identifiziert werden, ist eine Beurteilung der Toxizität mittels chronischer Tests nicht erforderlich, da von solchen Substanzen eine chronische Wirkung vorausgesetzt wird (EC, 2003).

CBZ wurde als sehr persistent identifiziert, für SMX, EE2 und AHTN liegen keine Ergebnisse von Wasser/Sediment-Transformationsstudien vor. Für die lipophilen Substanzen EE2 und AHTN wurden $BCFs_{(FG)} < 2000$ ermittelt, somit wird von keiner der Substanzen das B-Kriterium erfüllt. Die für SMX in einem chronischen Phototoxizitätstest mit *L. gibba* ermittelte NOEC von 0,01 mg/L (Brain et al., 2004; vgl. Tab. 8.7 im Anhang) entspricht dem Schwellenwert der Kategorisierung des T-Kriteriums. EE2 wird in diesem Zusammenhang als toxisch eingestuft, da es einerseits ein bekanntes endokrines Potenzial aufweist, andererseits eine hohe chronische Toxizität für *D. rerio* mit einer $LC_{50/28\text{ d}}$ von 100 ng EE2/L festgestellt wurde (Wenzel et al., 2001; vgl. Tab. 8.8 im Anhang). Auf Grund der verfügbaren Datenlage kann keine der untersuchten Substanzen als PBT- bzw. vPvB-Substanz kategorisiert werden.

4.6 Ergebnis der Umweltrisikobewertungen für die ausgewählten PPCPs

Wasser

Die mehrstufige Umweltrisikobewertung der Substanzen in Oberflächengewässer zeigt ein niedriges, vertretbares Risiko durch die Exposition von CBZ und AHTN an. Allerdings liegen die von Wiegel et al. (2004) gemessenen Maximalkonzentrationen im Einzugsgebiet der Elbe teilweise höher als die PNEC von 2,5 µg/L. Eine Einflussnahme auf aquatische Ökosysteme durch die Anwesenheit von CBZ in Oberflächengewässern kann deshalb nicht ausgeschlossen werden.

Für die beiden anderen untersuchten Substanzen SMX und EE2 wurde mittels der verfeinerten Umweltrisikobewertung in Phase II Stufe B ein nicht vertretbares Risiko für die aquatische Umwelt festgestellt, wobei das PEC/PNEC-Verhältnis für SMX nur knapp oberhalb von 1 lag, jenes für EE2 allerdings mit 21 deutlich darüber.

Um das Risiko durch SMX genauer zu untersuchen, müsste zumindest eine Langzeit-NOEC für eine weitere trophische Ebene (z.B. Daphnien oder Fische) ermittelt werden. Würde sich dabei eine gleichwertige oder geringere Toxizität als gegenüber *Lemna* herausstellen, würde auf Grund der höheren Anzahl chronischer Effektdaten der Bewertungsfaktor herabgesetzt und dadurch die PNEC erhöht werden. Auf diesem Wege könnte ein PEC/PNEC-Verhältnis < 1 erreicht und das zuvor indizierte Umweltrisiko formal entkräftet werden. Anderenfalls müssten gemäß dem Umweltrisikobewertungsschema Vorsorge- und Sicherungsmaßnahmen getroffen und ein Risikomanagement eingeleitet werden.

Trotz der niedrigen Umweltkonzentration und dadurch geringen Exposition von EE2 wurde mit dem beschriebenen Verfahren ein nicht vertretbares Risiko für die aquatische Umwelt festgestellt, welches auf dem sehr großen endokrinen (östrogenen) Potenzial dieses synthetischen Steroids beruht. Betrachtet man vergleichsweise chronische Effektdaten für EE2, die nicht auf subletale Parameter wie die Befruchtungsrate, sondern auf Mortalität beruhen (Wenzel et al., 2001), ergibt sich zwar ein PEC/PNEC-Verhältnis < 1 , der Wert von 0,63 liegt allerdings nahe dem Schwellenwert von 1 (Tab. 4.4). Dies verdeutlicht außer der großen endokrinen Wirksamkeit von EE2 die hohe chronische Toxizität gegenüber Fischen.

Sediment

Für SMX wurde auf Grund der physikalischen und chemischen Eigenschaften vorausgesetzt, dass durch diese Substanz eine umweltrelevante Exposition aquatischer Sedimente unwahrscheinlich ist.

Für das Kompartiment Sediment wurde ein durch CBZ ausgehendes, nicht akzeptables Umweltisiko festgestellt ($\text{PEC/PNEC} = 15,7$). Dieses Ergebnis sollte allerdings als erste Einschätzung des Umwelttrisikos für das Kompartiment Sediment betrachtet werden, da die $\text{PEC}_{\text{Sediment}}$ auf Grund fehlender Freilandmessungen gemäß den Vorgaben des TGD abgeschätzt wurde. Dieser Abschätzung lag jedoch ein mittels eines Modells berechneter K_{oc} zu Grunde. Insofern sind die Fehlerquellen und dadurch entstehende Unsicherheiten sehr groß.

Für EE2 und AHTN wurde angenommen, dass auf Grund der schlechten Bioabbaubarkeit, der hohen Adsorptionskoeffizienten und der hohen Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten eine Exposition von Sedimenten möglich ist, weshalb für diese Substanzen Sediment-Toxizitätsstudien mit *L. variegatus* durchgeführt wurden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studien konnte für das Kompartiment Sediment ein vertretbares, niedriges Risiko, ausgehend durch die Exposition von EE2, festgestellt werden. Für AHTN wurde ein PEC/PNEC-Verhältnis von 0,96 ermittelt, was zwar knapp unterhalb von 1 liegt und somit formal ein vertretbares Umweltisiko anzeigt, jedoch ist auf Grund der begrenzten Datenlage sowohl auf der Effektseite (PNEC) als auch auf der Expositionsseite (PEC) ein Risiko für benthische Organismen nicht auszuschließen.

Prädatoren (secondary poisoning)

Mit den lipophilen und potenziell bioakkumulativen Substanzen EE2 und AHTN wurden in Fisch-Biokonzentrationsstudien und bei Freilandmessungen Biokonzentrationsfaktoren von jeweils < 2.000 gemessen (Tab. 4.6). Für AHTN wurde gemäß des im TGD vorgeschlagenen Verfahrens ein niedriges Risiko für fischfressende Prädatoren festgestellt (van de Plassche & Balk, 1997).

Für EE2 wurde *secondary poisoning* für wurmfressende Fische über die Nahrungskette Wasser → Sediment → Wurm → Fisch betrachtet. Dabei stellte sich ein potenzielles Risiko für

wurmfressende Fische heraus, obwohl, wie oben diskutiert wurde, die Aussagekraft dieser Feststellung auf Grund der begrenzten Datenlage reduziert ist.

Boden

Die hohen Adsorptionskoeffizienten (K_{oc}) von EE2 und AHTN erfordern gemäß dem Richtlinienentwurf eine Bewertung der Toxizität gegenüber terrestrischen Organismen. Für EE2 konnten keine entsprechenden Studien in der Literatur gefunden werden. Die nach dem TGD (EC, 1996) durchgeführte Umweltrisikobewertung von AHTN ergab für das terrestrische Kompartiment mit einem PEC/PNEC-Verhältnis von 0,86 ein niedriges Risiko für die Umwelt (van de Plassche & Balk, 1997). Allerdings ist auch hier die Datenlage limitiert, da im Rahmen der genannten Umweltrisikobewertung die Exposition von AHTN ausschließlich basierend auf den Substanzeigenschaften mittels EUSES abgeschätzt wurde.

PBT und vPvB

Für keine der hier betrachteten Substanzen wurden alle drei Kriterien zur Persistenz, Bioakkumulierbarkeit und Toxizität erfüllt, weshalb gemäß dem Richtlinienentwurf, bzw. entsprechend den Maßgaben des TGD keine Maßnahmen getroffen werden müssen.

4.7 Möglichkeiten zur Verfeinerung der durchgeführten Umweltrisikobewertungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Phase II Stufe A geforderten physikalischen und chemischen Parameter lediglich aus Literaturquellen entnommen, wobei einige Werte auf Abschätzungen mittels Modellberechnungen beruhen, andere z.T. nicht verfügbar waren. Generell sollten diese Parameter für alle Substanzen auf experimenteller Basis ermittelt werden, um für weitere Betrachtungen in Phase II Stufe B eine größere Verlässlichkeit zu erreichen.

Auf Grund spezifischer physikalischer und chemischer Eigenschaften von EE2 und AHTN und den Resultaten bereits vorliegender Langzeitstudien müssten entsprechend den Schwellenwerten und Anforderungen des Richtlinienentwurfs mit beiden Substanzen mehrere ergänzende Studien durchgeführt werden, um das ökotoxikologische Potenzial gegenüber terrestrischen (und sedimentbewohnenden) Organismen, sowie das Potenzial *secondary poisoning* zu verursachen, bewerten zu können.

Ein potenzielles Umweltrisiko, ausgehend durch CBZ, ist vor allem durch seine sehr hohe Persistenz und der chronischen Toxizität gegenüber Arthropoden bedingt. Als empfindlichste Organismen in Langzeitstudien erwiesen sich der Kleinkrebs *C. dubia* im Wasser und die Insektenlarve *C. riparius* im aquatischen Sediment. Auf Grund des moderaten Adsorptionskoeffizienten (K_{oc}) und der Ergebnisse einer Wasser/Sediment-Transformationsstudie (Löffler et al., eingereicht 10/2004) ist anzunehmen, dass eine relevante Exposition des Sediments unter natürlichen Bedingungen besteht. Bei einer ersten Abschätzung des Umweltrisikos für Sedimentorganismen wurde ein Risiko festgestellt. Zwecks einer Verfeinerung dieser Risikoabschätzung ist es notwendig, die Datenlage zum Verhalten und Verbleib der Substanz in der

Umwelt (vor allem im Sediment) durch weitere Studien mit realitätsnäheren Bedingungen oder Feilandmessungen zu verbessern.

Die PBT- und vPvB-Kriterien wurden von keiner der ausgewählten Substanzen erfüllt, allerdings beruht diese Aussage auf einer sehr begrenzten Datenlage. Zur Beurteilung des P-Kriteriums liegen lediglich für CBZ gemessene Daten vor, wonach CBZ als sehr persistent klassifiziert wurde. Es kann allerdings angenommen werden, dass auch die anderen hier betrachteten Substanzen eine erhöhte Persistenz besitzen, da sie als nicht bioabbaubar oder potenziell bioabbaubar eingestuft wurden. Des Weiteren wurde der für EE2 bestimmte BCF von Individuen abgeleitet, die bei der gewählten EE2-Konzentration toxische subletale Effekte aufwiesen (vgl. Abschnitt 4.5.2). Da EE2 ein großes endokrines Potenzial besitzt und außerdem sehr toxisch ist ($LC_{50/28\text{ d}} = 100\text{ ng/L}$; Wenzel et al., 2001), sollte zur Beurteilung der PBT-Kriterien der BCF bei nicht toxischen Konzentrationen bestimmt und die Persistenz unter Anwendung der empfohlenen Richtlinie überprüft werden.

5 Diskussion des EMEA-Richtlinienentwurfs

5.1 Eine spezifische Umweltrisikobewertung für Humanpharmaka?

Rückstände von Arzneimittelwirkstoffen treten ubiquitär in Oberflächen-, Grund- und teilweise auch Trinkwässern auf. Auf Grund der inhärenten Eigenschaften solcher Substanzen und der Erkenntnis, dass Vertreter dieser Substanzgruppe im niedrigen umweltrelevanten Konzentrationsbereich Wirkungen auf Organismen ausüben, sind Umweltrisikobewertungen von Arzneimitteln zwingend erforderlich. Mit den Bemühungen der EMEA zur Erstellung eines Richtlinienentwurfs wurden wichtige Schritte hin zu einer Verabschiedung eines rechtlich bindenden Bewertungskonzeptes unternommen. Der EMEA-Richtlinienentwurf (EMEA, 2003a) stellt eine erhebliche Weiterentwicklung des sehr allgemein gehaltenen Diskussionspapiers aus dem Jahr 2001 dar, wobei viele der vom *Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment* (CSTEE, 2001) geäußerten Empfehlungen Berücksichtigung fanden. Trotzdem geht der Richtlinienentwurf, der speziell auf die Bewertung des Umweltrisikos von Humanpharmaka ausgerichtet werden soll, bezüglich des Bewertungsschemas nur wenig auf die Besonderheiten und spezifischen Eigenschaften dieser Substanzgruppe ein. Prinzipiell orientiert sich das Bewertungsschema sehr an den Vorgaben des TGD (EC, 2003), welches zur Umweltrisikobewertung von Chemikalien und Bioziden Verwendung findet. Die wenigen Anpassungen an spezifische Eigenschaften von Humanpharmaka beziehen sich auf:

- die Einführung eines Schwellenwertes bei der anfänglichen Expositionsabschätzung,
- das Außerkraftsetzen des Schwellenwertes bei Substanzen, die eine besondere potenzielle Gefahr darstellen (z.B. endokrin wirksame Substanzen),
- die Berücksichtigung von internen Metaboliten nach der Körperpassage, sofern sie in relevanten Mengen zu erwarten sind,
- die mögliche Berücksichtigung der Exkretionsrate beim Menschen bei der Verfeinerung der PEC in Phase II Stufe B,
- den Vorschlag entsprechender Vorsichts- und Sicherungsmaßnahmen bei der Feststellung eines bestehenden Risikos für die Umwelt, wie Verordnungsbeschränkungen (z.B. nur in Krankenhäusern und Hospitälern) oder spezifische Produktkennzeichnung auf Beipackzetteln wie Warnhinweise und Vorschriften umweltfreundlicher Entsorgung.

Bei den durchzuführenden ökotoxikologischen Studien werden die spezifischen Eigenschaften von Humanpharmaka nicht berücksichtigt, sondern es werden ausschließlich Daten von standardisierten Prüfrichtlinien verlangt. Eine Ausnahme hierbei stellt die Anforderung eines Belebtschlamm-Respirationshemmtests (OECD, 1984d) dar, der die spezifische Wirkung von antimikrobiellen Wirkstoffen erfassen soll, und die Empfehlung der Verwendung von Cyanobakterien an Stelle von Grünalgen in Phase II Stufe A. In beiden Stufen der Phase II des Bewertungsverfahrens wird stets auf die Regeln und Prinzipien des TGD verwiesen, d.h. es sollen die gleichen Methoden und Testverfahren angewendet werden, die für die Bewertung von Chemikalien und Bioziden verwendet werden.

Eine Konsequenz daraus könnte sein, dass im Zuge der Bestrebungen der Europäischen Kommission zur Harmonisierung der Chemikalien-Politik (CEC, 2001) die Durchführung von Umweltrisikobewertungen von Humanpharmaka gemäß dem TGD gefordert werden, mit dem Unterschied, dass ein erkanntes Umweltrisiko nicht in eine Zulassungsverweigerung oder -beschränkung führt, sondern in ein zielorientiertes, auf Humanpharmaka angepasstes Risikomanagement, bzw. in Vorsorge- und Sicherungsmaßnahmen. Humanpharmaka, oder Pharmaka im Allgemeinen, besitzen allerdings per se eine große biologische Aktivität sowie zu meist eine beschränkte Bioabbaubarkeit, weshalb sie unter Umweltaspekten eine besondere Substanzgruppe darstellen. Aus diesem Grund wurde bereits 1998 eine Richtlinie zur Durchführung von Umweltrisikobewertungen für Veterinärpharmaka in Kraft gesetzt (EMA, 1997), die spezifisch auf besondere Expositionswege und Eigenschaften dieser Substanzen eingeht. In gleicher Weise sollte für Humanpharmaka eine Richtlinie verabschiedet werden, die konkret auf die Eigenschaften bezüglich des Umweltverhaltens (*fate*) und des Wirkungsspektrums (Effekte) solcher Substanzen eingeht und gezielt die umfangreichen Vorkenntnisse aus pharmakologischen und toxikologischen Studien in das Bewertungsschema integriert.

Das europäische Konzept zur Umweltrisikobewertung von Humanpharmaka in Form des Richtlinienentwurfs zielt zudem ausschließlich auf die Bewertung von ‚neuen‘ Wirkstoffen im Rahmen des Zulassungsverfahrens. Alte, bereits auf dem Markt vorhandene Pharmaka und deren Wirkstoffe sollten jedoch in den Bewertungsprozess mit einbezogen werden, da nachteilige Auswirkungen auf die Umwelt gerade durch solche bisher teilweise in großen Mengen ausgebrachten und bezüglich ihrer Umweltgefährdung nicht überprüften Substanzen nicht auszuschließen sind. Analog zu den Prioritätenlisten von Chemikalien (European Chemicals Bureau: <http://ecb.jrc.it/existing-chemicals>) sollten Arzneimittelwirkstoffe identifiziert werden, durch welche auf Grund ihrer inhärenten Eigenschaften und auf Grund von bisherigen Untersuchungen ein erhöhtes Umweltrisiko anzunehmen ist. Solche Wirkstoffe sollten prioritär auf ihre Umweltgefährdung hin untersucht werden.

5.2 Anwendung eines Schwellenwertes bei der anfänglichen Expositionsabschätzung

In Phase I des Richtlinienentwurfs wurde ein expositionsbezogener Schwellenwert („*action limit*“) eingeführt, der bei Überschreiten eine tiefergehende Umweltrisikobewertung in Phase II auslöst. Als Ausnahmeregelung wurden Arzneimittelwirkstoffe, die ein außergewöhnliches ökotoxikologisches Potenzial besitzen (z.B. endokrin wirksame Stoffe) von der Überprüfung in Phase I ausgenommen. Zur Beurteilung, ob von einer Substanz ein außergewöhnliches ökotoxikologisches Potenzial ausgeht, fordert der Richtlinienentwurf eine „integrierte Experten-Evaluierung“, die hierfür Erkenntnisse aus klinischen und ökotoxikologischen Studien heranziehen soll. Erfahrungen über ökotoxikologische Wirksamkeiten von Humanpharmaka oder Arzneimittelgruppen sind jedoch bisher nur begrenzt vorhanden. Außerdem sind Erkenntnisse aus klinischen Studien nur bedingt auf mögliche Auswirkungen auf Organismen in der Umwelt übertragbar, worauf später näher eingegangen wird.

Die in Phase I abgeschätzte PEC korreliert direkt mit der maximalen Tagesdosis des Arzneimittelwirkstoffs (vgl. Kap. 1.4.2 und Kap. 3.1). Die anderen Variablen der zu Grunde liegenden Formel sind festgelegte Standardwerte; das heißt, dass ein Arzneimittel, bzw. dessen Wirkstoff der zu einer maximalen Tagesdosis von 2 mg verabreicht wird, zu einer $PEC \leq 10 \text{ ng/L}$ führt und für diese Substanz auf Grund des Schwellenwertes keine Umweltrisikobewertung durchzuführen wäre. Allerdings entfalten zahlreiche Substanzen bereits bei niedrigeren Tagesdosen ihre spezifische Wirksamkeit, besitzen also ein hohes biologisches Wirkpotenzial. Beispiele hierfür sind außer den natürlichen und synthetischen Hormonen verschiedene Psycholeptika (z.B. Flunitrazepam: 1 mg/d, Triazolam: 0,25 mg/d) oder ACE-Hemmer (Trandolapril: 2 mg/d) (WHO Collaborating Centre, 2003). Gerade solche Substanzen sollten einer Umweltrisikobewertung unterzogen werden. Stattdessen impliziert das Konzept des Richtlinienentwurfs, dass von Wirkstoffen, die zu einer maximalen Tagesdosis von $< 2 \text{ mg/d}$ verabreicht werden, ein geringes, vernachlässigbares Gefährdungspotenzial für die Umwelt ausgeht. Das in dieser Arbeit behandelte Steroid EE2 dient als gutes Beispiel für eine Substanz, die bei der anfänglichen PEC-Abschätzung den Schwellenwert von 10 ng/L nicht erreicht, in Langzeitstudien aber hoch toxisch ist ($LC_{50/28 \text{ d}} = 100 \text{ ng/L}$, Wenzel et al., 2001), unabhängig von der östrogenen Wirksamkeit.

Die Anwendung des Schwellenwertes ist wissenschaftlich nicht begründet. Substanzen können in Konzentrationen unterhalb des Schwellenwertes Effekte auf Organismen ausüben, die somit nicht erfasst würden. Es wird daher empfohlen, auf die Anwendung eines Schwellenwertes im Umweltrisikobewertungsverfahren zu verzichten und stattdessen mit allen Arzneimittelwirkstoffen, die bereits in niedrigen Dosen eine biologische Wirksamkeit im eigentlichen Zielorganismus (Mensch) aufweisen, chronische Effektstudien für die Umweltrisikobewertung vorzunehmen.

5.3 Integration des Kompartiments Sediment in das Bewertungsschema

Auf Grund der intrinsischen Eigenschaften und Persistenz vieler Pharmakawirkstoffe ist die Kontamination natürlicher Sedimente ein wahrscheinliches Expositionsszenarium, obwohl bisher nur wenige gemessene Daten über die Belastung von Sedimenten verfügbar sind. In dem EMEA-Richtlinienentwurf vorausgehenden Diskussionspapier (EMEA, 2001) war das Kompartiment Sediment zunächst nicht berücksichtigt. In der überarbeiteten Version (EMEA, 2003a) wurde jedoch die Ermittlung der Toxizität gegenüber sedimentbewohnenden Organismen für solche Wirkstoffe gefordert, die im Test der aeroben und anaeroben Transformation in aquatischen Sedimentsystemen (OECD, 2002b) eine „extensive Verlagerung“ der Substanz von der Wasserphase in das Sediment aufweisen. Allerdings ist der Terminus „extensive Verlagerung“ im Richtlinienentwurf nicht näher definiert. Für Teststrategien und die Bewertung der Toxizität gegenüber sedimentbewohnende Organismen wird auf im TGD vorgeschlagene Verfahren verwiesen.

Die Integration weiterer Umweltkompartimente wie Sediment und Boden in das Bewertungsschema stellt eine erhebliche Erweiterung der Bewertungsstrategien im Richtlinienentwurf dar. Zwar wurden in den eigens durchgeführten Sediment-Toxizitätsstudien mit EE2 und AHTN keine Effekte auf *L. variegatus* in umweltrelevanten Konzentrationen festgestellt (vgl. Abschnitt 0), jedoch führten die Ergebnisse der Studien mit CBZ von Oetken et al. (eingereicht) in der Risikocharakterisierung zu einem nicht vertretbaren Umweltrisiko für das Kompartiment Sediment (vgl. Abschnitt 4.5.1). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit einer umfassenden kompartiment-spezifischen Betrachtung des Umweltrisikos von Substanzen in Abhängigkeit von deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt.

5.4 Integration pharmakologischer Erkenntnisse in die Umweltrisikobewertung

Für Humanpharmaka sind vielfältige Erkenntnisse und Informationen aus den für die Entwicklung und Zulassung erforderlichen (human-)toxikologischen und pharmakologischen Untersuchungen vorhanden. Im Richtlinienentwurf wird gefordert, dass eine integrierte Beurteilung von Experten dieses Vorwissen über die Substanzen in der Umweltrisikobewertung berücksichtigen soll. Bei einigen Arzneimittelgruppen ist das Wissen über Pharmakodynamik der Substanzen auf mögliche Wirkungen in der Umwelt und entsprechend darauf ausgerichteten Teststrategien anwendbar. Jørgensen & Halling-Sørensen (2000) teilen die in der Umwelt durch Pharmaka möglicherweise verursachten Effekte in drei Kategorien ein: (1) „normale“ toxische Effekte, die auch durch andere Xenobiotika verursacht werden können, (2) antimikrobiell verursachte Effekte und (3) endokrin verursachte Effekte. Die „normalen“ toxischen Effekte umfassen alle Auswirkungen auf Organismen, die durch etablierte Teststrategien und Bewertungsmethoden für Chemikalien und Pestizide erfasst werden können. Die spezifischen Wirkungsweisen der beiden anderen Effektkategorien erfordern allerdings spezifische Teststrategien.

5.4.1 Antimikrobiell wirksame Stoffe

Antimikrobielle Wirkstoffe (Antibiotika) sind eine besondere Substanzgruppe, da sie nicht entwickelt wurden, um gezielt in physiologische Prozesse des Menschen einzugreifen, sondern der Zielorganismus im Menschen vorhandene pathogene Mikroorganismen sind. Pathogene Mikroorganismen unterscheiden sich allerdings bezüglich ihres basalen Stoffwechsels und Reproduktionsweise nicht von symbiotischen, kommensalen oder in der Umwelt vorkommenden Mikroorganismen. Deshalb stellen in die Umwelt gelangte Antibiotika potenziell eine Gefahr für mikrobielle Biozönosen dar. Darüber hinaus sind manche Antibiotikagruppen wie Tetracycline und Fluoroquinolone sehr persistent (Midtvedt, 2001a,b). Eine besondere Exposition besteht gegenüber der mikrobiellen Lebensgemeinschaft im Belebtschlamm in Kläranlagen. In Laborstudien zeigte z.B. das Antibiotikum Ciprofloxacin ein hohes toxisches Potenzial gegenüber Belebtschlamm-Bakterien (Halling-Sørensen et al., 2000). Außerdem spielen Mikroorganismen eine wesentliche Rolle im Stoffkreislauf der Ökosysteme, wo sie

erheblich zum Abbau und der Mineralisation von organischer Materie beitragen. (Dickinson & Pugh, 1974).

Ein anderes vieldiskutiertes Thema ist die Resistenzbildung pathogener Mikroorganismen, die vielfach durch unkontrollierten und unsachgemäßen Gebrauch von Antibiotika gefördert wird. Durch die vermehrte und stets steigende Anwendung von Antibiotika während des letzten halben Jahrhunderts ist die Resistenzbildung inzwischen zu einem ökologischen und sozialen Problem angewachsen (Levy, 1997). Andere Faktoren wie das Zusammentreffen von Patienten in Krankenhäusern, Globalisierung von Nahrungsmitteltransporten und das erhöhte weltweite Reiseaufkommen spielen eine große Rolle bei der Verbreitung resistenter Mikroorganismen (EMA, 1999b). Baquero et al. (1997) zeigten, dass bereits geringe Antibiotika-Konzentrationen die Bildung von Resistenzen fördern können. Manche bakteriellen Krankheitserreger wie *Salmonella*, *Shigella* oder *Haemophilus influenzae* sind heute nur noch mit einer begrenzten Auswahl spezifischer Antibiotika behandelbar (Cohen, 1997). In Krankenhäusern verursachen Infektionen durch Stämme Antibiotika-resistenter Erreger wie *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, Enterokokken und eine Vielzahl gram-negativer Stäbchenbakterien eine erhöhte Anzahl an Erkrankungen und Mortalitäten (Cohen, 1997). Eine Besonderheit der Resistenzbildung ist der irreversible Langzeit-Effekt durch die Veränderung des Genpools der Mikroorganismen. Eine Übersicht über die Resistenz-Problematik geben Chadwick & Goode (1997).

Eine den Antibiotika verwandte Wirkstoffgruppe sind die Antiparasitika, die spezifisch auf Ekto- und Endoparasiten des Menschen wirken. Effekte auf entsprechende Tiergruppen (z.B. Nematoden) in der Umwelt sind zu erwarten, weshalb spezifische Teststrategien zur Erkennung der Effekte in der Umwelt erforderlich sind. Da jedoch im Gegensatz zur Veterinärmedizin die Menge der Antiparasitika in der Humanmedizin eine untergeordnete Rolle spielt (Rönnefahrt et al., 2002), sollte die Bewertung des Umweltrisikos im Rahmen des Zulassungsverfahrens für Veterinärpharmaka ausreichend berücksichtigt werden.

5.4.2 Endokrin wirksame Stoffe

Die dritte von Jørgensen & Halling-Sørensen (2000) beschriebene Effektkategorie sind die durch endokrin wirksame Substanzen verursachten Effekte. Entsprechende Arzneimittelgruppen sind natürliche und synthetische Hormone, die hauptsächlich bei Hormon-Substitutionstherapien oder zur Empfängnisverhütung eingesetzt werden. Hormone sind auf Grund ihres Wirkungsmechanismus, bei dem Signalverstärkung und Reaktionskaskaden eine Rolle spielen, in extrem niedrigen Konzentrationen biologisch wirksam.

Endokrine Systeme sind im gesamten Tierreich verbreitet und existieren bereits bei niederen Invertebraten. Innerhalb der Vertebraten sind diese Systeme phylogenetisch hoch konserviert (Matthiesen, 2000). Im gesamten Tierreich sind jedoch die den hormonell gesteuerten Prozessen zu Grunde liegenden Strukturen (Hormone und Rezeptoren) evolutionsbiologisch besser konserviert, als die durch sie ausgelösten Mechanismen und Funktionen (LaFont, 2000). Auch

Invertebraten besitzen komplexe endokrine Systeme, die denen der Vertebraten ähnlich sind, sich aber bezüglich ihrer chemischen Signalvermittlung in vielfältiger Weise unterscheiden können (Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003a). Bei Invertebraten werden zusätzlich zur Entwicklung, Wachstum und Reproduktion spezifische Prozesse wie z.B. die Bildung von Larval- und Puppenstadium, Metamorphosen oder Diapause hormonell gesteuert. Bei Mollusken und Echinodermen wurden das Vorkommen und die Synthese von vertebratenähnlichen Steroiden festgestellt, allerdings ist die physiologische Funktion noch ungeklärt (La-Font, 2000). Bei den meisten Invertebraten sind die endokrinen Systeme nur wenig untersucht. Eine Ausnahme hierbei stellen die Insekten dar, deren endokrine Systeme zumeist zu Zwecken des Pflanzenschutzes erforscht wurden (DeFur et al., 1999; Oetken et al., 2004).

Auf Grund der zentralen Rolle von hormonell gesteuerten physiologischen Prozessen ist es sinnvoll und notwendig, die Wirkung von Arzneimitteln mit endokriner Aktivität auf Organismen zu untersuchen. Hierzu sind in der Regel chronische Effektstudien nötig, um Veränderungen in der Entwicklung und Reproduktion von Organismen erfassen zu können.

5.4.3 Stoffe mit anderen Wirkungsweisen

Erkenntnisse über antimikrobielles oder endokrines Potenzial eines Arzneimittelwirkstoffs leiten sich entweder von der beabsichtigten Wirkungsweise, oder von im Rahmen des Entwicklungs- und Zulassungsverfahrens durchgeführten pharmakologischen und toxikologischen Studien ab. Basierend auf diesen Erkenntnissen können und sollten spezifische ökotoxikologische Studien durchgeführt werden (z.B. Test auf Förderung der Resistenzbildung, Reproduktionsstudien), um potenzielle Umweltgefährdungen festzustellen. Zur Klärung der Frage, ob andere Wirkungsweisen oder pharmakologische Eigenschaften von Humanpharmaka Hinweise auf mögliche Effekte bei Organismen in der Umwelt liefern, soll zunächst der Unterschied zwischen Wirkungsweise („*mode of action*“) und Wirkungsmechanismus („*mechanism of action*“) erläutert werden.

Wirkungsweise und Wirkungsmechanismus laufen auf verschiedenen biologischen Organisationsebenen ab. Die Wirkungsweise bezieht sich auf den Effekt eines Wirkstoffes auf organischer oder organismischer Ebene. Dieser Effekt kann endokrin oder antibiotisch, aber auch neurologisch, dermatologisch, hämatologisch, antiphlogistisch, hepatisch, diuretisch usw. sein. Wirkungsweisen lassen sich auf zellulärer oder molekularer Ebene durch biochemische oder biophysikalische Wirkungsmechanismen erklären. Fünf allgemeine Wirkungsmechanismen können unterschieden werden (Mutschler, 1996):

- Interaktionen mit spezifischen Rezeptoren,
- Öffnen oder Blockieren von spannungsabhängigen Ionenkanälen,
- Beeinflussung von Transportsystemen,
- Hemmung oder Aktivierung von Enzymen,
- Beeinflussung von Biosynthesen in Mikroorganismen.

Diese allgemeinen Wirkungsmechanismen umfassen vielfältige spezifische Wirkungsmechanismen, die bei vielen Arzneimittelwirkstoffen nicht im Detail verstanden sind. Die Beziehungen zwischen Wirkungsweisen und Wirkungsmechanismen sind komplex, zumal einer Wirkungsweise nicht ein spezifischer Wirkungsmechanismus zu Grunde gelegt werden kann. Diese Komplexität wird umso größer, wenn Pharmaka mehrere Wirkungsweisen besitzen. Die Acetylsalicylsäure ist z.B. analgetisch (schmerzlindernd), antiphlogistisch (entzündungshemmend), antipyretisch (fiebersenkend), antirheumatisch und als Inhibitor der Thrombozytenaggregation wirksam. Noch vielschichtiger wird das Geflecht von Wirkungsweisen und Wirkungsmechanismen, wenn man außer der beabsichtigten Wirkungsweise(n) beim Menschen auch die möglichen unerwünschten Wirkungen (Nebenwirkungen) berücksichtigt. Der Pharmakologe G. Kuschinsky betont: „Wenn behauptet wird, dass eine Substanz keine Nebenwirkungen zeigt, so besteht der dringende Verdacht, dass sie auch keine Hauptwirkung hat.“ (Kuschinsky & Lüllmann, 1986). In Einzelfällen können Nebenwirkungen sogar in ihrer Intensität den (oder die) gewünschten Wirkungen übersteigen und so zum Abbruch der Medikation führen. Die den Nebeneffekten zu Grunde liegenden Wirkungsmechanismen bleiben bei pharmakologischen Studien in der Regel ungeklärt.

Die Vielfältigkeit möglicher Nebenwirkungen von pharmakologischen Wirkstoffen soll am Beispiel des Carbamazepins (CBZ) verdeutlicht werden. CBZ wirkt antiepileptisch, wird aber u.a. auch als Schmerzmittel bei Trigeminusneuralgie (Gesichtsschmerzen) und als Psychopharmakon bei manisch-depressiven Patienten eingesetzt. Seine primäre Wirkungsweise ist also neurologisch. Die möglichen Nebenwirkungen und ihre Wirkungsweisen sind allerdings bei weitem vielfältiger. In der Fachinformation eines Arzneimittelpräparats mit CBZ als Wirkstoff werden insgesamt 111 unerwünschte Wirkungen beim Menschen aufgelistet (s. Abschnitt 8.1.1 im Anhang). Die am häufigsten auftretenden Nebenwirkungen sind neurologischen Wirkungsweisen zuzuordnen, wie Somnolenz (Bewusstseinsstörungen), Schwindel, Schläfrigkeit oder Ataxie (Störung der Bewegungsabläufe). Sporadisch kommen vorübergehende Sehstörungen, depressive Verstimmungen, Tinnitus und Halluzinationen vor. Nebenwirkungen mit anderen Wirkungsweisen, wie z.B. Wirkungen auf die Augen, Haut und Schleimhäute, das Gefäßsystem, Blut- und Lymphsystem, auf Leber, Galle und Atmungsorgane, auf den Urogenital- und Gastrointestinal-Trakt, auf das Herz- und Kreislaufsystem und sogar den Hormonstatus (Schilddrüsenfunktionsparameter) werden ebenfalls aufgelistet.

Können die pharmakologischen Wirkungsweisen bei der Bestimmung des Umweltrisikos von Arzneimittelwirkstoffen hilfreich sein? Die Hemmung der Reproduktion bei *D. magna* durch CBZ (Kap. 2.1.7) lässt sich mit der antiepileptischen Wirkungsweise beim Menschen nicht erklären, ebenso wenig wie durch die bekannten Nebenwirkungen. Auch die durch CBZ verringerte Schlupfrate bei *C. riparius* (Oetken et al., eingereicht; vgl. Kap. 4.5.1) ist durch die Wirkungsweise beim Menschen nicht vorhersagbar. Ein anderes Beispiel aus Seiler (2002): das Antidepressivum Fluvoxamin wird beim Menschen als selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer zur Stimmungsaufhellung eingesetzt und induziert bei der Süßwassermuschel *Sphaerium striatinum* den Laichvorgang (Fong et al., 1998). Schließlich testeten Pascoe et al. (2003) mehrere Humanpharmaka auf ihre akute und chronische Toxizität gegen-

über dem Süßwasserpolyphen *Hydra vulgaris*. Diazepam (ein Psychopharmakon), Digoxin (Steigerung der Herzleistung bei chronischer Herzinsuffizienz) und Amlodipin (Kalziumantagonist bei Bluthochdruck) verhinderten die Regeneration von Hypostomium, Fuß und Tentakel von zuvor behandelten Polypen bei einer Konzentration von 10 µg/L. All diese Beispiele veranschaulichen, dass Pharmaka, die mit dem Ziel einer spezifischen biologischen Wirkung beim Menschen entwickelt wurden, verschiedenste unvorhersehbare Effekte bei Organismen verursachen können. Deshalb ist es nicht sinnvoll, Teststrategien für Umweltrisikobewertungen auf die spezifische und beim Menschen beabsichtigte Wirkungsweise anzupassen.

Pharmakodynamische Wirkungen und Wirkungen auf Organismen in der Umwelt finden bei sehr unterschiedlichen Konzentrationen statt. Therapeutische Plasmakonzentrationen liegen zumeist um den Faktor 10^4 - 10^6 höher als zu erwartende Konzentrationen in der aquatischen Umwelt (Seiler, 2002). Die in der Regel reversible Reaktion auf ein eingenommenes Arzneimittel erfolgt beim Menschen innerhalb kurzer Zeit (Minuten bis Stunden), wohingegen Effekte bei geringen Umweltkonzentrationen auf Nicht-Zielorganismen erst nach längerer Exposition in Erscheinung treten (Römbke et al., 1996).

Trotz allem sollten die umfangreichen pharmakodynamischen Erkenntnisse aus klinischen Studien nicht unbeachtet bleiben, da in verschiedenen Organismen ähnliche Stoffwechsel- und Reaktionswege unterschiedliche Funktionen ausüben können. Zum Beispiel erfüllen Prostaglandine eine wichtige Funktion bei der Bildung der Eierschale von Vögeln. Beim Menschen werden Prostaglandine in verschiedensten Körpergeweben gebildet und verursachen dort bereits in geringen Konzentrationen vielfältige Wirkungen. Unter anderem spielen sie eine Rolle bei der lokalen Regulation der Durchblutung (Entzündungsreaktion) und als membranständige Schutzfaktoren mit pathophysiologischer Bedeutung bei Schmerz, Fieber und Entzündung. Die Exposition gegenüber dem COX-Inhibitor Indomethacin, welcher die Hemmung der Prostaglandinsynthese bewirkt und beim Menschen als nichtsteroidales Antirheumatikum eingesetzt wird, führte in Experimenten mit Vögeln ebenfalls zur Hemmung der Biosynthese der Prostaglandine und folglich zu verdünnten Eierschalen (Seiler, 2002).

Wenn also spezifische Substanz-Rezeptor-Interaktionen beim Menschen bekannt sind und auf Grund bekannter analoger Strukturen bei anderen Organismen nachteilige Auswirkungen vermutet werden, so sollten Teststrategien entwickelt oder erweitert werden, um Vertreter entsprechender Organismen gezielt auf substanzbedingte Effekte untersuchen zu können. Leider sind spezifische Interaktionen zwischen Arzneimittelwirkstoffen und physiologischen Strukturen bei Organismen in der Umwelt nur in Ausnahmefällen bekannt (z.B. östrogen wirksame Substanzen auf die Vitellogenininduktion bei Fischen). Häufig sind spezifische Wirkungsmechanismen selbst beim Menschen nicht im Detail verstanden (Coulson, 1988; Mutschler, 1996), weshalb es nur in seltenen Fällen möglich sein wird, auf Wirkungsmechanismen angepasste Strategien für Testorganismen zu entwickeln.

Antibiotische und endokrin wirksame Pharmaka sind bisher die einzigen Wirkstoffgruppen von Humanpharmaka, deren beim Menschen bekannten Wirkungsweisen und teilweise auch

Wirkungsmechanismen analogen Mechanismen bei anderen Organismen entsprechen. Zur Vorbeugung von Langzeit-Effekten in der Umwelt und gleichzeitig zum Schutz der Gesundheit des Menschen ist es notwendig, mögliche Auswirkungen von Antibiotika und endokrinen Wirkstoffen in der Umwelt gezielt zu erfassen und nach Möglichkeit die medizinische Anwendung dieser Substanzgruppen zu optimieren. Entsprechende Regelungen sind im EMEA-Richtlinienentwurf jedoch nicht enthalten.

Bei anderen Wirkungsweisen und deren Effekte auf Organismen ist die ökologische Relevanz der Auswirkungen häufig ungeklärt. Die in der Ökotoxikologie als umweltrelevant anerkannten Endpunkte sind Mortalität bzw. Überlebensrate, Wachstum und Reproduktion (Römbke & Moltmann, 1996). Akute Mortalität ist auf Grund der niedrigen in der Umwelt auftretenden Konzentrationen von Humanpharmaka nicht vorrangig zu erwarten, sondern eher subletale Beeinträchtigungen der Lebensfunktionen (Römbke et al, 1996). Diese erst nach längerer Zeit auftretenden Wirkungen werden dann zu relevanten ökologischen Effekten, wenn sie die Reproduktion eines Organismus, und somit die Größe und das Fortbestehen einer Population beeinflussen können. Inwiefern mögliche Auswirkungen von Arzneimittelwirkstoffen auf Organismen der Umwelt mit ökotoxikologischen Kurzzeitstudien erfasst werden können und welche Endpunkte als umweltrelevant berücksichtigt werden sollten, wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

5.5 Standard-Kurzzeittests zur Überprüfung der Ökotoxizität von Humanpharmaka

Die meisten bisher verfügbaren Effektdaten ökotoxikologischer Studien mit Humanpharmaka basieren auf Kurzzeitstudien mit Algen und Daphnien, teilweise auch mit Fischen, wobei die Effektkonzentrationen zumeist im mg/L-Bereich liegen (Webb, 2001; s. auch Tab. 8.6-8.9 im Anhang). Akute Effekte auf Wachstum und Überleben sind bei den niedrigen in der Umwelt auftretenden Konzentrationen von Humanpharmaka im ng/L- bis µg/L-Bereich nicht zu erwarten. Allerdings können auf Grund der kontinuierlichen Exposition chronische Effekte bei Organismen in der Umwelt nicht ausgeschlossen werden. Die meisten der wenigen veröffentlichten chronischen Effektdaten stammen von Studien mit endokrin wirksamen natürlichen und synthetischen Hormonen. Bei Multigenerationsstudien mit Fischen stellte sich heraus, dass durch endokrine Disruptoren bei sehr niedrigen Konzentrationen verursachte Effekte teilweise erst in der Folgegeneration (F_1) auftreten und zu Störungen der Reproduktion führen (z.B. Nash et al., 2004). Chronische Effektdaten für andere Substanzen beruhen meist auf Daphnien-Reproduktionstests oder auf Studien mit einzelligen Algen, die auf Grund der kurzen Generationsdauer der Testorganismen auch als chronische Tests gewertet werden können (Webb, 2001).

In der Umweltrisikobewertung wird zur Herleitung der PNEC ein Bewertungsfaktor von 1000 ($10 \times 10 \times 10$) auf akute Effektdaten angewendet. Dieser Bewertungsfaktor berücksichtigt mit dem Faktor 10 die Extrapolation von akuter auf chronische Toxizität. Weitere Faktoren zu jeweils 10 beziehen sich auf Intra- und Interspeziesvariationen bezüglich der Empfindlichkeit

der Organismen und die Übertragung von Labordaten auf reale Umweltbedingungen (vgl. Kap. 4). Das Verhältnis von LC₅₀- oder EC₅₀-Werten mit NOECs für Invertebraten und Fische für 72 Industriechemikalien resultierte in A/C-Verhältnisse (akute zu chronischen Effektkonzentrationen) von 0,126 bis 1.290 (ECETOC, 1993). Das 50. Perzentil und das 90. Perzentil lagen in dieser Skala bei 9 und 73, was zeigt, dass sehr große Verhältnisse zwischen akuten und chronischen Effektkonzentrationen bei Chemikalien selten sind. Der Faktor 10 für die Extrapolation von akuter auf chronische Toxizität beruht auf solche Erfahrungen mit Chemikalien.

Basierend auf den Vergleich von akuten mit chronischen Effektdaten für 20 Humanpharmaka folgte Webb (2001), dass das bisher für Industriechemikalien verwendete Schema der Bewertungsfaktoren auch für Humanpharmaka angemessen sei. Allerdings beruht diese Aussage hauptsächlich auf den Vergleich von Effektdaten aus Algentests, bei welchen die akute EC₅₀ und die chronische NOEC jeweils aus demselben Datensatz hergeleitet werden. Lediglich für 6 Pharmaka waren akute und chronische Daten für *Daphnia* sp. verfügbar, die alle ein A/C-Verhältnis ≥ 10 ergaben (Webb, 2001; Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Akute Toxizität (LC₅₀ oder EC₅₀) aus Kurzzeitstudien, chronische Toxizität (NOEC) aus Langzeitstudien mit denselben Substanzen und Organismen, und das Verhältnis von akuter zu chronischer Toxizität (A/C). Alle Konzentrationen in mg/L.

Substanz	Spezies	L(E)C ₅₀ ¹	NOEC ²	A/C	Referenz
Clofibrinsäure	<i>D. magna</i>	28,2	0,01	2.820	
Diethylstilbestrol	<i>D. magna</i>	4,0	0,062	65	
Etidronsäure	<i>D. magna</i>	527	> 12	< 44	zitiert in Webb (2001)
Iopromid	<i>D. magna</i>	> 10.000	> 1.000	10	
Nikotin	<i>D. magna</i> , <i>D. pulex</i>	3	0,07 (LOEC _{Körperlänge})	43	
Salicylsäure	<i>D. magna</i>	230	< 20	> 12	
Carbamazepin	<i>C. dubia</i>	77,7	0,025	3.108	Ferrari et al. (2003)
	<i>D. magna</i>	13,8	0,4 ³	35	
17 α - Ethinylestradiol	<i>D. magna</i>	5,7	0,01	570	Kopf (1997)
	<i>D. rerio</i>	1,72	0,0001 (LC ₅₀ Mortalität)	17.200	Wenzel et al. (1999, 2001)
	<i>D. rerio</i>	1,72	3 x 10 ⁻⁷ (NOEC _{Befruchtungsrate})	5,7 x 10 ⁶	
Diazepam	<i>H. vulgaris</i>	> 1,0	0,01 (LOEC _{Regeneration})	> 100	Pascoe et al. (2003)
Digoxin	<i>H. vulgaris</i>	> 1,0	0,01 (LOEC _{Regeneration})	> 100	
Amlodipin	<i>H. vulgaris</i>	> 1,0	0,01 (LOEC _{Regeneration})	> 100	

¹: Endpunkte: Mortalität (*D. rerio* und *H. vulgaris*) oder Immobilisierung (*Daphnia* sp. und *Ceriodaphnia* sp.);

²: Endpunkt wenn nicht anders angegeben: Reproduktion; ³: eigene Studie (Kap. 2.2.2).

Die größten A/C-Verhältnisse der untersuchten Arzneimittelwirkstoffe betragen 3.108 bei CBZ und 17.200 bei EE2. Berücksichtigt man durch endokrine Wirkungen verursachte Effekte, wie im Fall von EE2 die Befruchtungsrate von *D. rerio*, so reicht das A/C-Verhältnis bis in den Millionenbereich (Tab. 5.1).

Der Faktor 10 zur Berücksichtigung der Extrapolation von akuten Effektdaten auf chronische Toxizität, der in dem Bewertungsfaktor von 1000 zur Herleitung einer PNEC aus Akutdaten

enthalten ist, reicht bei Arzneimittelwirkstoffen in vielen Fällen nicht aus. Allerdings lässt der Richtlinienentwurf eine Erhöhung des Bewertungsfaktors in begründeten Einzelfällen zu. Jedoch werden keine Kriterien genannt, mit denen in solchen Einzelfällen eine Erhöhung zu rechtfertigen wäre.

Zudem ist anzunehmen, dass die bei hohen Konzentrationen in Kurzzeitstudien festgestellten Effekte auf Überleben und Wachstum häufig auf anderen biologischen Mechanismen beruhen, als Effekte bei Langzeitstudien. Die zum Teil bei niedrigen Konzentrationen beobachtete Hemmung der Reproduktion von Kleinkrebsen, die Mortalität von *Danio rerio* in chronischen Studien und die Regenerationsfähigkeit von *Hydra vulgaris* wurden von Wirkstoffen aus unterschiedlichen Arzneimittelgruppen verursacht. Dies wiederum reflektiert das Problem der Vorhersage von Effekten auf Grund von bestimmten Wirkungsweisen.

Aus diesen Gründen sind Langzeittests zur Bewertung der Umweltgefährdung durch Arzneimittelwirkstoffe besser geeignet als Kurzzeittests. Bei Verfügbarkeit von Biomarkern können diese zur Identifizierung von Wirkungen auf Organismen und zur Festlegung einer PNEC durchaus verwendet werden, wenn der Zusammenhang mit ökotoxikologisch relevanten Endpunkten gezeigt worden ist.

5.6 Entwicklungskosten von Humanpharmaka - Kosten ökotoxikologischer Studien

Die Forderung nach ökotoxikologischen Langzeitstudien zur Verbesserung der Bewertung des Umweltrisikos durch Humanpharmaka birgt einen Mehraufwand an Arbeit, Zeit und Kosten in sich. Um diesen Mehraufwand in Relation zu den für die Forschung und Entwicklung eines Pharmakons entstehenden Kosten zu stellen, sollen hier einige Daten des Jahres 2002 aus dem jährlichen statistischen Überblick des ‚Verbands forschender Arzneimittelhersteller e.V.‘ vergleichend angeführt werden (VfA, 2003). Die Kosten der Forschung und Entwicklung eines neuen Medikaments betrugen weltweit durchschnittlich 800 Mio. US\$ pro Wirkstoff, die durchschnittliche Dauer der Entwicklung eines Medikaments beträgt 12 Jahre. Die pharmazeutische Industrie in Deutschland erzielte einen Umsatz von 23,2 Mrd. €. Für die Arzneimittelforschung wurden in Deutschland ca. 3,6 Mrd. € ausgegeben. Die Anzahl der in Deutschland neu zugelassenen Wirkstoffe betrug 27 (VfA, 2003).

Die Kosten für die Durchführung aller ökotoxikologischen Tests im Rahmen des Zulassungsverfahrens von Veterinärpharmaka wurden von Römbke et al. (1996) nach einer Schätzung für 1995 auf 201.000 (*fate*-Studien) bzw. 135.000 (Wirkungsstudien) US\$ beziffert. Würden für die Zulassung von Humanpharmaka obligatorisch Langzeitstudien an Organismen verschiedener trophischer Ebenen gefordert werden, könnten sich die Kosten nach einer konservativen Schätzung auf 500.000 bis 1 Mio. US\$ belaufen. Im Vergleich zu den oben genannten durchschnittlichen Gesamtkosten von 800 Mio. US\$ entspricht dieser Betrag einem Anteil von 0,125%.

In Anbetracht des Verhältnisses der aus ökotoxikologischen Studien entstehenden Kosten zu den Gesamtkosten für die Entwicklung eines Pharmakons und den entsprechend zu erwartenden Umsätzen durch die Vermarktung eines Arzneimittels sind die Forderungen nach Langzeitstudien im Rahmen des Zulassungsverfahrens dem Arzneimittelhersteller und dem Konsumenten durchaus zumutbar. Schließlich beruhen diese Forderungen auf Erkenntnissen von durch Pharmaka ausgehenden Umweltgefährdungen und dienen mittels des Vorsorgeprinzips primär einer gesunden Umwelt und somit auch dem Wohl des Menschen.

5.7 Vorschläge zur Verbesserung des bestehenden Konzepts zur Durchführung von Umweltrisikobewertungen für Humanpharmaka

Für Ökosysteme ist es irrelevant, ob Wirkungen durch Humanpharmaka oder eine andere Gruppe von Chemikalien verursacht werden. Der Anwendungszweck einer Substanz ist für eine Umweltrisikobewertung nur insofern wichtig, als dadurch die Menge und die Eintragspfade der Substanz in die Umwelt bestimmt werden. Entsprechend sollte eine Umweltrisikobewertung, durch welche Chemikalie auch immer die Umweltgefährdung ausgeht, nach den gleichen wissenschaftlich begründeten Regeln durchgeführt werden (Jørgensen & Halling-Sørensen, 2000; CEC, 2001).

In den folgenden Abschnitten (5.7.1 bis 5.7.7) werden bezüglich der zuvor diskutierten Inhalte des EMEA-Richtlinienentwurfs (EMA, 2003a) Vorschläge zur Verbesserung des Bewertungskonzepts entworfen. Eine Kommentierung des Richtlinienentwurfs, in welche u.a. einige der nachfolgend angeführten Argumente integriert wurden, wurde im Rahmen des POSEIDON-Projekts unter Federführung der ECT Ökotoxikologie GmbH erarbeitet und im Januar 2004 bei der zuständigen europäischen Behörde (EMA, London) eingereicht.

5.7.1 Außerkraftsetzen des Schwellenwerts in der Expositionsabschätzung

Arzneimittelwirkstoffe mit einer maximalen Tagesdosis von 2 mg/d resultieren nach der im Richtlinienentwurf vorgeschlagenen Berechnung bei entsprechenden Standardwerten für den täglichen Wasserverbrauch und die Verdünnungsrate im Oberflächengewässer in eine $PEC \leq 10 \text{ ng/L}$. Für diese Substanzen wäre nach dem vorgeschlagenen Schema keine Umweltrisikobewertung durchzuführen. In Abschnitt 5.2 wurden Beispiele für Wirkstoffe genannt, u.a. das in dieser Arbeit behandelte EE2, die zu einer Tagesdosis von 2 mg/d oder weniger verordnet werden. Solche Substanzen sind im Allgemeinen biologisch hoch aktiv, weshalb diese generell nicht aus einer Umweltrisikobewertung ausgeschlossen werden sollten. Da die Anwendung des Schwellenwertes außerdem wissenschaftlich nicht validiert ist, sollte sie keine Legitimierung in einer rechtsverbindlichen Richtlinie erhalten.

5.7.2 Berücksichtigung von Pharmaka ohne definierbarer Tagesdosis in der Expositionsabschätzung

Nach der im Richtlinienentwurf vorgeschlagenen Methode ist die maximale Tagesdosis die Grundlage für die PEC-Berechnung in Phase I und II. Eine definierte Tagesdosis ist in dieser Form allerdings nur für oral verabreichte Arzneimittelprodukte verfügbar. Für Arzneimittel zur epikutanen Applikation (Auftragung auf die Haut) oder diagnostische Produkte (z.B. Röntgenkontrastmittel) gibt es keine analoge maximale Tagesdosis. Da für solche Wirkstoffe eine PEC mit der genannten Methode nicht ermittelt werden kann, sollte die im Diskussionspapier (EMA, 2001) vorgeschlagene Berechnungsmethode, die auf das zu erwartende Verkaufsvolumen basiert, als Alternative zur Verfügung gestellt werden.

5.7.3 Kriterien zur Auslösung der Bewertung des Kompartiments Sediment

Das Kriterium zur Auslösung der Bewertung des Kompartiments Sediment ist im Richtlinienentwurf nicht eindeutig definiert, sondern es wird beschrieben als „extensive Verlagerung“ („*extensive shifting*“) der Substanz von der Wasserphase in das Sediment. Es wird daher empfohlen, entweder einen mittels der zu Grunde liegenden Richtlinie (OECD, 2002b) zu bestimmenden Wasser-Sediment-Verteilungskoeffizienten als Maßstab anzuwenden, oder wie im TGD den $\log K_{oc}$ oder $\log K_{ow} > 3$ als Schwellenwert anzusetzen.

5.7.4 Kriterien zur Auslösung der Bewertung des terrestrischen Kompartiments

Für eine Expositionsabschätzung des terrestrischen Kompartiments ist es nicht ausreichend, ausschließlich den K_{oc} als Entscheidungskriterium heranzuziehen, da bei Verteilungs- und Adsorptionsprozessen außer unspezifischen molekularen Interaktionen weitere Faktoren eine wichtige Rolle spielen können. Spezifische Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen und ionische Wechselwirkungen sind dabei von den Matriceigenschaften abhängig und können erheblich stärker als unspezifische Wechselwirkungen sein (Schwarzenbach et al., 2003). Daher sollten in eine terrestrische Expositionsabschätzung Parameter wie die Säurekonstante der Substanz (pK_a) und der pH der umgebenden Matrix (z.B. Klärschlamm) integriert werden.

5.7.5 Testmethoden für antimikrobielle Wirkstoffe

Antibiotika sollten so konzipiert werden, dass ein schneller Abbau in der Umwelt gewährleistet wird, wie es z.B. bei dem Antibiotikum Zink-Bacitracin der Fall ist (Midtvedt, 2001a). Neue Antibiotika zeigen jedoch häufig eine hohe Persistenz gegenüber mikrobiellem Abbau (Midtvedt, 2001b). Im Rahmen des Zulassungsverfahrens für Veterinärpharmaka werden seit Anfang des Jahres 2003 spezifische Studien gefordert, um das Potenzial der Resistenzbildung bei Mikroorganismen durch die vorgesehene Applikation von Antibiotika zu bewerten (EMA, 2002). Solche Studien sollten in gleichem Umfang für antibiotische Humanpharmaka gefordert und die Ergebnisse in die Umweltrisikobewertung integriert werden. Dabei sollte die Ausrichtung der Studien nicht auf die aquatische Umwelt begrenzt bleiben, da die Resi-

tenzbildung durch das Ausbringen von Klärschlämmen auch in der terrestrischen Umwelt gefördert werden kann (Rooklidge, 2004). Die im Richtlinienentwurf vorgeschlagenen Testmethoden in Phase II Stufe A mit Cyanobakterien *und* Grünalgen sollten obligat durchgeführt werden, da diese Organismen verschiedenen entwicklungsbiologischen Organisationsebenen angehören und deshalb unterschiedliche Empfindlichkeiten auftreten können. Aus dem Resultat des Belebtschlamm-Respirationshemmtests OECD 209 (OECD, 1984d) wird eine PNEC-Mikroorganismus hergeleitet, die mit der $PEC_{\text{Oberflächengewässer}}$ verglichen werden soll. Sinnvoller wäre an dieser Stelle die PNEC mit der zu erwartenden PEC für Kläranlagenzulauf zu vergleichen.

5.7.6 Testmethoden für endokrin wirksame Stoffe

Als Ursache für den Rückgang der Spermiedichte oder hormonbedingte Krebsformen beim Menschen werden endokrine Disruptoren verdächtigt (Seibert, 1996; Gies et al., 2001). Die Wahrscheinlichkeit solcher Vermutungen erhöht sich, wenn man bedenkt, dass die in Oberflächengewässern gemessenen Östradiol-Konzentrationen (Belfroid et al., 1999; Adler et al., 2001; Huang & Sedlak, 2001) den im Blutplasma gemessenen Konzentrationen bei präpubertären Mädchen und Jungen entsprechen (Andersson & Skakkebak, 1999). Die Inzidenz einiger Krankheiten, wie Hodenkrebs bei jungen Männern und Allergien, hat in den letzten Jahrzehnten erheblich zugenommen. Zwar sind die Ursachen für diese Erkrankungen noch nicht geklärt, doch scheint die Besorgnis berechtigt zu sein, dass trotz zeitlicher Divergenz zwischen Exposition und Effekt ein kausaler Zusammenhang zwischen bestimmten Chemikalien und Allergien besteht (CEC, 2001). In der Ökotoxikologie jedoch sind endokrine Wirkungen auf Organismen durch Einzelsubstanz-Studien bestätigt worden. Beispiele sind die Vitellogenininduktion bei Fischen (Duis & Knacker, 2003; Chikae et al., 2004) oder Imposex und Vermännlichung bei Prosobranchia (Oehlmann et al., 1999a, 1999b).

Verschiedene nationale und internationale Initiativen, insbesondere der Europäischen Union, OECD, USA und Japan, wurden seit Mitte der 1990er Jahre unternommen, um mögliche Auswirkungen durch endokrine Disruptoren auf die Umwelt und den Menschen systematisch zu identifizieren und bewerten. Zum Beispiel wurde in der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung OECD 1996 eine Arbeitsgruppe etabliert, die sich ausschließlich mit Testmethoden und Bewertungsstrategien von endokriner Disruption befasst; im gleichen Jahr veranstaltete die Europäische Kommission einen Workshop zu den Auswirkungen von endokrinen Disruptoren auf die Gesundheit des Menschen und der Umwelt in Weybridge, U.K. Vor Kurzem wurde der Europäischen Kommission ein Bericht vorgelegt (IEH *Institute for Environment and Health*, 2003), der aktuelle Aktivitäten, Initiativen und Projekte zusammenfasst und beschreibt, mit dem Ziel, einen internationalen, globalen Informationsaustausch zu fördern und koordinieren.

Trotz der intensiven internationalen Diskussion über mögliche nachteilige Auswirkungen durch endokrine Disruptoren auf Mensch und Umwelt sieht der EMEA-Richtlinienentwurf (EMEA, 2003a) nicht ausdrücklich vor, potenziell endokrin wirksame Substanzen mit spezi-

fisch darauf angepassten Testmethoden auf ihre Umweltgefährdung hin zu untersuchen. Berücksichtigt wird diese Substanzgruppe lediglich in Phase I des Bewertungsschemas bei der Entscheidung, ob bei einer zu erwartenden Exposition unterhalb des Schwellenwertes für sie eine Umweltrisikobewertung durchgeführt werden soll oder nicht. Im weiteren Verlauf sollen endokrin wirksame Substanzen gemäß dem mehrstufigen Bewertungsschema des Richtlinienentwurfs in gleicher Weise wie alle anderen Wirkstoffe zunächst mittels Kurzzeitstudien getestet werden, obwohl bekannt ist, dass nach langfristiger Exposition bei niedrigen Konzentrationen endokrin vermittelte Prozesse häufig erst verzögert, oder sogar erst in der nachfolgenden Generation auftreten (Kime, 1998). Auf Grund der zentralen und wesentlichen Rolle von hormonell gesteuerten Vorgängen auf Lebens- und Reproduktionsprozesse sollten jedoch endokrin wirksame Arzneistoffe (deren endokrine Aktivität auf Grund des Vorwissens durch pharmakologische Untersuchungen bekannt ist), mittels chronischer Effekstudien auf ihre Auswirkungen gegenüber Organismen in der Umwelt getestet werden.

Da endokrine Wirkungen auch durch andere Mechanismen als die direkte Bindung einer Substanz an einen Hormonrezeptor vermittelt werden (LaFont, 2000), sind diese Wirkungen nicht auf Substanzen beschränkt, die Strukturanalogien mit natürlichen Hormonen aufweisen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die androgene Wirkung von Tributylzinn auf Mollusken, welche vermutlich durch die Inhibition der Cytochrom P-450 abhängigen Aromatase bewirkt wird (Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003b). Aus diesem Grund sollte generell mit allen Arzneimittelwirkstoffen geeignete „*screening*“-Tests zum Nachweis eines endokrinen Potenzials durchgeführt werden.

Für den Nachweis von endokriner Wirksamkeit bei Organismen der Umwelt wurden einige *in vivo*- und *in vitro*-*screening*-Testmethoden entwickelt, die jedoch noch nicht als validierte Methoden im Richtlinienformat verfügbar sind. Verfügbare *in vitro*-Methoden auf zellulärer Ebene beziehen sich meist auf östrogene Aktivität, wie Vitellogenininduktion und Rezeptorbindung, und reflektieren oft nur unzureichend den Grad an potenziellen Möglichkeiten zur endokrinen Disruption (OECD, 2002a). Aus diesem Grund sollten *in vitro*-Tests durch am intakten Organismus durchgeführte *in vivo*-Tests ergänzt werden. Verfügbare *in vivo*-Testmethoden sind meist auf Fische beschränkt, wie z.B. der OECD-Richtlinienentwurf „*14-day fish assay for identification of potential endocrine disrupting chemicals*“ (OECD, 2001a). Die hierbei untersuchten Endpunkte sind morphologische und histologische Veränderungen sekundärer Sexualmerkmale oder der Gonaden, sowie der Serum-Vitellogeningehalt. Für Invertebraten gibt es bisher kaum spezifische Testmethoden auf endokrine Disruption, obwohl diese bereits vielfach, verursacht durch verschiedenste Chemikalien, bei Invertebraten aus unterschiedlichen Phyla festgestellt wurde (DeFur et al., 1999; Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003a). Dies liegt nicht zuletzt an der großen Vielfalt endokriner Systeme innerhalb dieser Tiergruppe, die bisher meist nicht im Detail verstanden sind. DeFur et al. (1999) haben einige Testmethoden für Arzneimittelwirkstoffe bezüglich Entwicklungs- und Reproduktionsparameter bei verschiedenen Invertebraten zusammengefasst. Eine anwendbare OECD-Richtlinie ist der Daphnien-Reproduktionstest (OECD, 1998b), der allerdings auf Grund der Tatsache, dass die Daphnien im Testverlauf unter Bedingungen der asexuellen Re-

produktion gehalten werden, nur bedingt als Testmethode zum Nachweis endokriner Disruption geeignet ist. Eine umfangreiche Übersicht über derzeit verfügbare Testmethoden zum Nachweis von endokriner Disruption (*in vitro* und *in vivo*) geben mehrere (Übersichts-) Artikel, z.B. Ankley et al (1998), Jobling (1998), Duis & Knacker (2002), Hutchinson (2002).

In vitro- und *in vivo*-screening-Tests sind jedoch meist sehr spezifisch auf bestimmte endokrine Wirkungen ausgerichtet, wie z.B. östrogene Wirkungen. Um andere mögliche endokrine Wirkungsweisen durch *screening*-Tests erfassen zu können, müsste eine ganze Palette solcher Tests entwickelt werden. Deshalb sollten *screening*-Tests nur als Anhaltspunkt für eine Umweltgefährdung gewertet werden. Bei Substanzmischungen in komplexen Umweltproben können synergistische, antagonistische und additive Interaktionen auftreten. Außerdem können manche Substanzen auf Grund von Bioabbau oder Metabolismus bei *in vitro*-Tests wirksam, bei *in vivo*-Tests aber unwirksam sein, und umgekehrt (Jobling, 1998). Die ökologische Relevanz auf Populationsebene von mittels *screening*-Tests festgestellter endokriner Wirksamkeit einer Substanz kann häufig nur ungenau beurteilt werden. Selbst bei Reproduktionsstörungen bei einzelnen in freier Wildbahn lebenden Tieren, die eindeutig auf endokrine Disruption zurückzuführen waren, konnte in der Mehrheit der Fälle nicht geklärt werden, ob diese Reproduktionsstörungen Auswirkungen auf der Populationsebene zur Folge hatten (Taylor & Harrison, 1999). Auch die Induktion von Vitellogenin bei männlichen Fischen, die häufig zum Nachweis östrogenen Aktivität verwendet wird, kann nicht definitiv als relevanter ökologischer Endpunkt bezeichnet werden, da bisher nicht geklärt ist, ab welcher Vitellogeninkonzentration relevante Auswirkungen auf Populationsebene zu erwarten sind. Bei positiven Ergebnissen von *screening*-Tests sollten deshalb chronische Tests in Form von „*full life-cycle*“-Studien oder besser Multigenerationsstudien durchgeführt werden, damit eine potenzielle Umweltgefährdung mit größerer Sicherheit und Genauigkeit beurteilt werden kann. Arzneimittelwirkstoffe, die bereits im Zielorganismus Mensch endokrine Wirksamkeit besitzen, sollten ohne vorheriges *screening* in angemessenen Langzeitstudien untersucht werden.

5.7.7 Obligatorische Durchführung von Langzeitstudien für alle Humanpharmaka

Wie gezeigt wurde ist es für eine Umweltrisikobewertung nicht ausreichend, mit endokrin wirkenden Substanzen Akutstudien durchzuführen. Auch Pharmaka anderer Wirkstoffgruppen verursachen bei äußerst geringen Konzentrationen chronische Effekte auf Organismen, die nicht auf ihre beim Menschen beabsichtigte Wirkungsweise zurückzuführen sind und ebenso wenig auf Grund ihrer akuten Toxizität erwartet werden konnten (z.B. Pascoe et al., 2003; vgl. Kap. 5.5). In den wenigsten Fällen können durch beim Menschen bekannte Wirkungsweisen Rückschlüsse auf mögliche Umweltgefährdungen gezogen werden (vgl. Abschnitt 5.4). Aus diesen Gründen und auf Grund der meist großen Persistenz und Stabilität von Pharmaka, des kontinuierlichen Eintrags in die Umwelt und der dadurch bedingten langfristigen, oft lebenslangen Exposition gegenüber diesen biologisch hochaktiven Substanzen sind subtilere und chronische Beeinträchtigungen der Lebensfunktionen von Organismen in der Umwelt wahrscheinlicher (Römbke et al., 1996). Folglich sollte mit allen Arzneimittelwirkstoffen chronische Langzeitstudien durchgeführt werden, um sicherere und aussagekräftigere

tigere Umweltrisikobewertungen zu ermöglichen. Zumindest aber sollte bei der Anwendung von akuten Effektdaten aus Kurzzeitstudien der Bewertungsfaktor von 1000 wesentlich erhöht werden, da bereits der Bereich zwischen Kurzzeit- und Langzeittoxizität um drei Größenordnungen voneinander abweichen kann (vgl. Abschnitt 5.5).

In Form verabschiedeter OECD-Richtlinien liegen der Daphnien-Reproduktionstest (OECD, 1998b) und verschiedene Fisch-Langzeittests vor (z.B. OECD, 1992b, 2000a). Für mehrere aquatische Organismen wurden bereits Testmethoden im OECD-Richtlinienformat als Entwürfe veröffentlicht, z.B. der Chironomiden-Toxizitätstest (OECD, 2003). Teilweise liegen auch Richtlinien(-entwürfe) nationaler U.S.-amerikanischer Institutionen vor, wie z.B. der chronische Toxizitätstest mit Mysidaceen (Schwebegarnelen) (U.S.EPA, 1996) oder die Richtlinie für akute, chronische und *life-cycle*-Toxizitätstests mit Polychaeten (ASTM, 1994). Viele Methoden für Langzeittests wurden für Organismen verschiedener taxonomischer Gruppen in aquatischen Systemen mit und ohne Sediment entwickelt und publiziert, z.B. chronische Toxizitätstests mit *Hyalella* sp. und *Gammarus* sp. (Borgmann et al., 1989), *Hydra vulgaris* (Pascoe et al., 2003), *Potamopyrgus antipodarum* (Duft et al., 2003 a,b) oder *Lumbriculus variegatus* (Phipps et al., 1993).

5.8 Risikomanagement und Risikominderungsmaßnahmen

Am Ende einer Umweltrisikobewertung steht für den Fall, dass ein von einer Substanz ausgehendes erhöhtes Umweltrisiko nicht ausgeschlossen werden kann, ein Risikomanagement, welches zum Ziel hat, das Umweltrisiko so weit wie möglich zu reduzieren. Das Bewertungsschema für Chemikalien und Biozide gemäß dem TGD (EC, 2003) sieht dabei vor, auch die Zulassung einer Substanz zu verweigern bzw. bei Altstoffen eine Zulassungsverlängerung nicht zu genehmigen. Im Richtlinienentwurf zur Umweltrisikobewertung von Humanpharmaka sind für den Fall, dass ein von einem Arzneimittelwirkstoff ausgehendes erhöhtes Umweltrisiko nicht ausgeschlossen werden kann, eine Nutzungsbeschränkung (z.B. nur in Krankenhäusern) und eine angemessene Produktkennzeichnung als mögliche Vorsorge- und Sicherungsmaßnahmen vorgesehen. Die Produktkennzeichnung (Etikett, Beipackzettel) umfasst spezifische Informationen zur sachgemäßen Benutzung, Aufbewahrung und Entsorgung, mit dem Ziel, die insgesamt in die Umwelt ausgebrachte Menge zu minimieren. Weitere Vorsorge- und Sicherungsmaßnahmen können vom Antragsteller vorgeschlagen werden. Im Fall der Verfügbarkeit alternativer Wirkstoffe mit dem gleichen zu erwartenden Behandlungserfolg und gleichzeitig einem geringeren Umweltrisiko sollte die Möglichkeit einer Zulassungsverweigerung jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Als Bestandteil des Risikomanagements ist gemäß dem TGD (EC, 2003) und der Richtlinie zur Umweltrisikobewertung von Veterinärpharmaka (EMA, 1997) eine Risiko-Nutzen-Analyse vorgesehen. Eine solche wird im Richtlinienentwurf für die Bewertung von Humanpharmaka (EMA, 2003a) nicht verlangt. In der Tat ist eine Risiko-Nutzen-Analyse im Fall von Humanpharmaka sehr schwierig, da weder das Risiko, noch der Nutzen direkt erfasst

werden können. Ein Risiko kann durch das Verhältnis der PEC zur PNEC charakterisiert werden, allerdings ist das tatsächliche Risiko durch die langjährige oder sogar lebenslange Exposition gegenüber in der Umwelt vorhandenen Pharmaka weder für die Umwelt noch für den Menschen mit Sicherheit zu quantifizieren. Der Nutzen von Humanpharmaka ist auf der anderen Seite, abgesehen vom Gewinn durch den Verkauf, ebenfalls schwer in Zahlen auszudrücken. Für den Einzelnen ist der Wert eines Arzneimittels unter Umständen unermesslich. Demnach sollte bei einem nachgewiesenen erhöhten Risiko für die Umwelt zumindest nach Möglichkeiten gesucht werden, das Umweltrisiko durch Anwendungsbeschränkungen oder -reduzierungen zu vermindern.

Weitere mögliche Risikominderungsmaßnahmen wurden im EU-Projekt POSEIDON von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Als sehr effektiv bei der Abwasserbehandlung und Trinkwasseraufbereitung erwiesen sich die Ozonung von gereinigtem Abwasser und der „*advanced oxidation process*“ AOP, bei dem die Verwendung von Ozon, Wasserstoffperoxid und UV-Bestrahlung kombiniert wird (Huber et al., 2003; Ternes et al., 2003a; Vogna et al., 2004). Viele organische Substanzen werden dabei eliminiert oder oxidiert, wobei gleichzeitig durch die Inaktivierung von Keimen eine Desinfektion des aufbereiteten Wassers bewirkt wird. In einer groben Kostenabschätzung für die Installation und Betreibung einer Abwasser-Ozonungsanlage, die in Abhängigkeit der Energiepreise und der Größe einer Anlage gewissen Schwankungen unterliegen, kommen die Autoren auf eine Summe von ca. 0,05 €/m³ gereinigten Abwassers.

Eine flächendeckende Realisierung von Ozonungsanlagen in Kläranlagen ist mittelfristig nicht umsetzbar. Ein erheblicher Anteil des Eintrags von Arzneimitteln in die Umwelt findet allerdings konzentriert in Krankenhäusern und Hospitälern statt. Für 80 häufig in Deutschland eingesetzte Arzneimittel wurde die Gesamtverkaufsmenge im Jahr 2001 auf über 1.500 t berechnet, wovon 23,5% auf Krankenhäuser fielen (BLAC, 2003). Zwar besitzen die meisten Krankenhäuser keine eigenen Kläranlagen, sondern sind an das kommunale Abwassernetz angeschlossen, doch könnten hier gezielte Investitionen und Bestrebungen, Krankenhausabwasser separat und mittels fortgeschrittener und moderner Klärtechniken zu behandeln, zu einer erheblichen Verringerung der Belastung in kommunalen Kläranlagen und somit der Oberflächengewässer beitragen. Eine zusätzlich mögliche und mittelfristig umsetzbare Maßnahme ist die Installation von sanitären Anlagen, die ein separates Auffangen von Urin und Faeces (Urinseparierung) und darauf folgender gezielter Abwasserbehandlung und Entsorgung, bzw. Weiterverwendung von Nährstoffen ermöglicht (www.novaquatis.ch).

6 Zusammenfassung

Humanpharmaka stellen eine permanente Belastung der Gewässer und ein Problem aller industrialisierten Länder dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gemäß dem von der Europäischen Arzneimittelagentur EMA entwickelten Konzept zur Durchführung von Umweltrisikobewertungen von Humanpharmaka mit mehreren ausgewählten Substanzen unterschiedlicher Stoffgruppen Umweltrisikobewertungen durchgeführt. Die hierfür ausgewählten Pharmaka sind das Antiepileptikum Carbamazepin (CBZ), das Antibiotikum Sulfamethoxazol (SMX) und das synthetische Östrogen 17 α -Ethinylöstradiol (EE2). Als Vertreter der Inhaltsstoffe von Körperpflegeprodukten wurde der polyzyklische Moschusduftstoff Tonolid (AHTN) in die Untersuchungen mit einbezogen. Humanpharmaka und Körperpflegeprodukte werden unter Umweltaspekten häufig als einheitliche Gruppe betrachtet, da sie beide auf Grund ihres hauptsächlichen Anwendungsgebietes in privaten Haushalten zu einem permanenten, diffusen Eintrag in die aquatische Umwelt führen und außerdem beide der Gesundheit bzw. der Hygiene des Menschen dienlich sind. Mit der Einbeziehung von AHTN soll überprüft werden, inwiefern der von der EMA entworfene Richtlinienentwurf zur Umweltrisikobewertung von Humanpharmaka auch auf Inhaltsstoffe von Körperpflegeprodukten anwendbar ist.

Mit Hilfe von Literaturrecherchen wurde die Datengrundlage für Expositionsabschätzungen bzw. für die Auswahl notwendiger ökotoxikologischer Studien für die Wirkungsabschätzungen bereitgestellt. Die aus den Literaturdaten hergeleiteten gemessenen Durchschnittskonzentrationen für deutsche Oberflächengewässer von 517 ng/L für CBZ, 140 ng/L für SMX, < 0,625 ng/L für EE2 und 311 ng/L für AHTN wurden mit Ergebnissen verschiedener Modellberechnungen verglichen und ausgewertet. Der vorhandene Datensatz zu ökotoxikologischen Kurzzeitstudien wurde mit entsprechenden Tests vervollständigt, und teilweise mit weiterführenden Langzeitstudien ergänzt.

Die mit den Ergebnissen der Expositions- und Wirkungsabschätzungen vorgenommenen Umweltrisikobewertungen ergaben im ersten Schritt (grobe Expositionsabschätzungen und auf Kurzzeitstudien basierende Wirkungsabschätzungen) unter den ausgewählten Substanzen lediglich für den Moschusduftstoff AHTN ein erhöhtes Umweltrisiko für Oberflächengewässer. Trotz dieses Resultats wurden für alle untersuchten Substanzen die Umweltrisikobewertungen fortgeführt, wobei in diesem zweiten Schritt gemessene Umweltkonzentrationen und Langzeit-Effektdaten als Verfeinerung der Expositions- und Wirkungsabschätzungen verwendet wurden. Daraufhin konnte das zunächst erkannte, durch AHTN indizierte Umweltrisiko entkräftet werden, jedoch ergaben die Risikocharakterisierungen für EE2 und SMX ein erhöhtes Risiko für das aquatische Kompartiment. Für diese Substanzen wären somit gemäß dem Konzept der EMA weiterführende spezifische Untersuchungen bzw. die Durchführung von Vorsorge- und Sicherungsmaßnahmen im Rahmen eines Risikomanagements erforderlich.

Auf Grund der erhöhten Adsorptionspotenziale von CBZ, EE2 und AHTN wurden für diese Substanzen kompartimentspezifische Umweltrisikocharakterisierungen durchgeführt. Dabei wurde ein erhöhtes Umweltrisiko durch CBZ für das Kompartiment Sediment angezeigt. Sediment-Toxizitätsstudien mit EE2 und AHTN resultierten in Effektkonzentrationen im mittleren mg/kg-Bereich, woraufhin für diese Substanzen ein geringes, vernachlässigbares Umweltrisiko für Sedimente festgestellt wurde.

Mittels aus der Literatur verfügbarer Biokonzentrationsfaktoren für EE2 und AHTN im Fisch wurde das Potenzial für ‚secondary poisoning‘ bewertet, welches die Möglichkeit des Transfers von Substanzen über kontaminierte Nahrung in einer fiktiven Nahrungskette und dadurch verursachte toxische Effekte beschreibt. Dabei wurde zunächst kein erhöhtes Umweltrisiko durch EE2 und AHTN festgestellt. Auf Grund des hohen endokrinen Potenzials von EE2 wurde jedoch eine Sediment-Bioakkumulationsstudie mit dem endobenthischen Oligochaeten *Lumbriculus variegatus* durchgeführt, welche in einen unerwartet hohen Akkumulationsfaktor resultierte. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie und den verfügbaren Fisch-Biokonzentrationsfaktoren wurde anhand der Nahrungskette Wasser → Sediment → Wurm → Fisch die Möglichkeit des ‚secondary poisonings‘ durch EE2 bei wurmfressenden Fischen unter natürlichen Bedingungen aufgezeigt. Zur Verwendung dieses Ergebnisses in einer Umweltrisikobewertung zum Zwecke der Zulassung von Pharmaka sollten weitergehende Untersuchungen zur Bestätigung durchgeführt werden.

Bezugnehmend auf die Resultate der eigenen Studien und auf die besonderen Eigenschaften von Humanpharmaka wurde der EMEA-Richtlinienentwurf diskutiert und Verbesserungsvorschläge erarbeitet. Bis auf wenige Anpassungen geht das EMEA-Bewertungsschema nicht auf die Besonderheiten und spezifischen Eigenschaften von Humanpharmaka ein. Hauptkritikpunkte bezogen sich auf (1) die Anwendung eines konzentrationsabhängigen Schwellenwertes als Entscheidungsgrundlage zur Durchführung einer Risikocharakterisierung, (2) das stufenweise Vorgehen bei der Wirkungsabschätzung mit zuerst ausschließlich auf Kurzzeitstudien basierenden Effektdaten, und (3) unzureichende Angaben zu Vorgehensweisen in der höheren Stufe des Bewertungsschemas, vor allem bei Substanzen mit außergewöhnlichem ökotoxikologischen Potenzial. Trotz der zur Zeit intensiven internationalen Diskussion über mögliche Auswirkungen durch endokrine Disruptoren auf Mensch und Umwelt sieht der EMEA-Richtlinienentwurf nicht ausdrücklich vor, die Umweltgefährdung durch potenziell endokrin wirksame Substanzen mit spezifischen Testmethoden festzustellen und zu bewerten.

Die Erkenntnis, dass spezifische Wirkmechanismen bei Chemikalien, speziell bei Arzneimitteln und Bioziden, auch in sehr niedrigen Konzentrationen zu Wirkungen in der Umwelt führen können, bleibt im EMEA-Richtlinienentwurf auf Grund der Einführung eines expositionsbezogenen Schwellenwertes und der Wirkungsabschätzung mittels Akutstudien nur unzureichend berücksichtigt. Zur Schließung dieser Lücke, die durch Untersuchungen zu endokrinen Wirkungen in der Umwelt offensichtlich wurde, müssen neue und bessere ökotoxikologische Instrumente entwickelt werden und das Umweltrisikobewertungsschema entsprechend erweitert und angepasst werden.

7 Literaturverzeichnis

- Adler, P., Steger-Hartmann, T. & Kalbfus, W. (2001) Vorkommen natürlicher und synthetischer östrogenen Steroide in Wässern des süd- und mitteldeutschen Raumes. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, **29**, 227-241.
- Aherne, G.W. & Briggs, R. (1989) The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **41**, 735-736.
- Al-Ahmad, A., Daschner, F.D. & Kümmerer, K. (1999) Biodegradability of Cefotiam, Ciprofloxacin, Meropenem, Penicillin G, and Sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **37**, 158-163.
- Alexander, M., Estler, C.J. & Legler, F. (1995) *Antibiotika und Chemotherapeutika: bakteriologische Grundlagen, Pharmakologie und therapeutischer Einsatz antibakteriell wirksamer Arzneistoffe*. 2. Aufl., Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 1-269.
- Allner, B., Wegener, G., Knacker, T. & Stahlschmidt-Allner, P. (1999) Electrophoretic determination of estrogen-induced protein in fish exposed to synthetic and naturally occurring chemicals. *The Science of the Total Environment*, **233**, 21-31.
- Alsterberg, G. (1922) Die respiratorischen Mechanismen der Tubificiden. Eine experimentell-physiologische Untersuchung auf ökologischer Grundlage. Lund, Hakan Ohlssons Buchdruckerei. 1-176.
- Andersen, L., Holbech, H., Gessbo, Å., Norrgren, L. & Petersen, G. (2003) Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **134**, 365-374.
- Andersson, A.-M. & Skakkebaek, N.E. (1999) Exposure to exogenous estrogens in food: possible impact on human development and health. *European Journal of Endocrinology*, **140**, 477-485.
- Andreozzi, R., Marotta, R., Pinto, G. & Pollio, A. (2002) Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Research*, **36**, 2869-2877.
- Andreozzi, R., Raffaele, M. & Nicklas, P. (2003) Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, **50**, 1319-1330.
- Ankley, G., Mihaich, E., Stahl, R., Tillit, D., Colborn, T., McMaster, S., Miller, R., Bantle, J., Campbell, P., Denslow, N., Dickerson, R., Folmar, R., Fry, M., Giesy, J., Gray, L.E., Guiney, P., Hutchinson, T., Kennedy, S., Kramer, V., LeBlanc, G., Mayes, M., Nimrod, A., Patino, R., Peterson, R., Purdy, R., Ringer, R., Thomas, P., Touart, L., van der Kraak, G. & Zacharewski, T. (1998) Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**, 68-87.
- Artola-Garicano, E., Sinnige, T.L., van Holsteijn, I., Vaes, W.H.J. & Hermens, J.L.M. (2003) Bioconcentration and acute toxicity of polycyclic musks in two benthic organisms (*Chironomus riparius* and *Lumbriculus variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**, 1086-1092.
- Ashton, D., Hilton, M. & Thomas, K.V. (2004) Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *The Science of the Total Environment*, **333**, 167-184.
- ASTM (1994) Standard guide for conducting acute, chronic, and life-cycle aquatic toxicity tests with polychaetous annelids - E1562-94. American Society for Testing and Materials ASTM, Book of standards, volume 11.05, August 2000. 1-21.
- Bachmann Christiansen, L., Winther-Nielsen, M. & Helweg, H. (2002) Feminisation of fish. The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature. Environmental Project No. 729, 2002, Danish Environmental Protection Agency. 1-184.
- Balch, G.C., Mackenzie, C.A. & Metcalfe, C.D. (2004) Alterations to gonadal development and reproductive success in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 782-791.
- Balk, F. & Ford, R.A. (1999a) Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCB in the EU. I. Fate and exposure assessment. *Toxicology Letters*, **111**, 57-79.
- Balk, F. & Ford, R.A. (1999b) Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCB in the EU. II. Effect assessment and risk characterisation. *Toxicology Letters*, **111**, 81-94.
- Baquero, F., Negri, M.C., Morosini, M.I. & Blázquez, J. (1997) The antibiotic selective process: concentration-specific amplification of low-level resistant populations. In *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*. Eds. Chadwick, D.J. & Goode, J.A., Chichester: Wiley. 93-111.
- Belfroid, A.C., Van der Horst, A., Vethaak, A.D., Schäfer, A.J., Rijs, G.B.J., Wegener, J. & Cofino, W.P. (1999) Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *The Science of the Total Environment*, **225**, 101-108.
- Bester, K., Hühnerfuss, H., Lange, W., Rimkus, G.G. & Theobald, N. (1998) Results of non target screening of lipophilic organic pollutants in the German Bight. II: Polycyclic musk fragrances. *Water Research*, **32**, 1857-1863.

- BLAC (1999) Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit. Arzneimittel in der Umwelt. Konzept für ein Untersuchungsprogramm. Hamburg. 1-41.
- BLAC (2003) Bund/Länderausschuss für Chemikaliensicherheit. Arzneimittel in der Umwelt - Auswertung der Untersuchungsergebnisse. Freie und Hansestadt Hamburg - Behörde für Umwelt und Gesundheit. Bericht an die 61. Umweltministerkonferenz (UMK) am 19./20. November 2003 in Hamburg; Publikationsfreigabe durch die 32. Amtschefkonferenz (ACK) am 06. November 2003 in Berlin. 1-173.
- Borgmann, U., Ralph, K.M. & Norwood, W.P. (1989) Toxicity test procedures for *Hyaella azteca*, and chronic toxicity of cadmium and pentachlorophenol to *H. azteca*, *Gammarus fasciatus*, and *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **18**, 756-764.
- Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K. & Solomon, K.R. (2004) Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 371-382.
- Breitholtz, M., Wollenberger, L. & Dinan, L. (2003) Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic Toxicology*, **63**, 103-118.
- Brunn, H. & Rimkus, G.G. (1997) Synthetische Moschusduftstoffe - Anwendung, Anreicherung in der Umwelt und Toxikologie. Teil 2: Toxikologie der synthetischen Moschusduftstoffe und Schlußfolgerungen. *Ernährungs-Umschau*, **44**, 4-9.
- Brust, K., Licht, O., Hultsch, V., Jungmann, D. & Nagel, R. (2001) Effects of terbutryn on aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in artificial indoor streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 2000-2007.
- Buerge, I.J., Buser, H.-R., Müller, M.D. & Poiger, T. (2003) Behavior of the polycyclic musks HHCB and AHTN in lakes, two potential anthropogenic markers for domestic wastewater in surface waters. *Environmental Science and Technology*, **37**, 5636-5644.
- Campbell, K.L. (1999) Sulphonamides: updates on use in veterinary medicine. *Veterinary Dermatology*, **10**, 205-215.
- Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S. & Levis, Y. (2004) Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *The Science of the Total Environment*, **324**, 55-66.
- CEC (2001) White Paper - Strategy for a future chemicals policy. COM(2001) 88 final. 1-32.
- Chadwick, D.J. & Goode, J.A. (1997) *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*. Chichester: Wiley. 1-260.
- Chikae, M., Ikeda, R., Hasan, Q., Morita, Y. & Tamiya, E. (2004) Effects of tamoxifen, 17 α -ethynylestradiol, flutamide, and methyltestosterone on plasma vitellogenin levels of male and female Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **17**, 29-33.
- Christensen, F.M. (1998) Pharmaceuticals in the environment - A human risk? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **28**, 212-221.
- Clara, M., Strenn, B. & Kreuzinger, N. (2002) Verhalten ausgewählter Pharmazeutika in der Abwasserreinigung. *Wiener Mitteilungen*, **178**, 113-138.
- Clara, M., Strenn, B. & Kreuzinger, N. (2004) Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: Investigations on the behaviour of carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. *Water Research*, **38**, 947-954.
- Cleuvers, M. (2002) Aquatische Ökotoxikologie ausgewählter Arzneimittel. Algentest und akuter Daphnientest. *UWSF – Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie*, **14**, 85-89.
- Cohen, M.L. (1997) Epidemiological factors influencing the emergence of antimicrobial resistance. In *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*. Eds. Chadwick, D. J. & Goode, J. A., Chichester: Wiley. 223-237.
- Coulson, C.J. (1988) *Molecular mechanisms of drug action*. London, New York, Philadelphia: Taylor & Francis. 1-276.
- CSTEE (2001) - Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment. Opinion on: Draft CPMP Discussion Paper on Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use [Non-Genetically Modified Organism (Non-GMO) Containing]. Brussels, European Commission. 1-22.
- Danielsson, B.R. (2000) Teratogenic mechanisms of anticonvulsant drugs. *Teratology*, **62**, 138-142.
- Daughton, C.G. & Ternes, T.A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, **107**, 907-938.
- de Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1997) Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Program. 1-20.
- DeFur, P.L., Crane, M., Ingersoll, C.G. & Tattersfield, L.J. (1999) Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing, and assessment. SETAC Technical Publication Series. 1-291.
- Dhainaut, A. & Scaps, P. (2001) Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Canadian Journal of Zoology*, **79**, 233-253.
- Dickinson, C.H. & Pugh, G.J.F. (1974) *Biology of plant litter decomposition*. London, New York: Academic Press. 2 vol.

- DIN (1985) DIN 38414. Schlamm und Sedimente (Gruppe S), Teil 2: Bestimmung des Wassergehaltes und des Trockenrückstandes bzw. der Trockensubstanz (S2). Teil 3: Bestimmung des Glührückstandes und des Glühverlustes der Trockenmasse eines Schlammes (S3). In *Deutsche Einheitsverfahren (DEV) zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*. Hrsg. Fachgr. Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Weinheim, New York: VCH.
- Doll, T.E. & Frimmel, F.H. (2003) Fate of pharmaceuticals – photodegradation by simulated solar UV-light. *Chemosphere*, **52**, 1757-1769.
- Drewes, C.D. (1996) Those wonderful worms. *Carolina Tips*, **59**, 17-20.
- Drewes, C.D. (2001) *Lumbriculus variegatus*: a biology profile. Electronic publication: <http://www.eeob.iastate.edu/faculty/DrewesC/htdocs> (Feb. 2001). 1-4.
- Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, L., Markert, B. & Oehlmann, J. (2003a) Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 145-152.
- Duft, M., Schulte-Oehlmann, U., Weltje, L., Tillmann, L., & Oehlmann, J. (2003b) Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology* **64**, 437-449.
- Duis, K. & Knacker, T. (2002) Testmethoden zur Erfassung östrogen wirksamer Substanzen in Kläranlagenabläufen. *GWF - Wasser/Abwasser*, **149**, 654-658.
- Duis, K. & Knacker, T. (2003) Untersuchungen zum Einfluss der Verfahrenstechnik in Kläranlagen auf die Eliminierung ausgewählter Östrogene und Xenoöstrogene aus dem Abwasser, Teilprojekt III: Wirkungsuntersuchungen. Abschlussbericht BMBF-Projekt: FKZ 02WA9980/6. Flörsheim/Main, ECT Oekotoxikologie GmbH. 1-72.
- EC (1994) Ad hoc working party on environmental risk assessment for non GMO containing medicinal products. Assessment of potential risks to the environment posed by medicinal products for human use (excluding products containing live genetically modified organisms): phase I environmental risk assessment. III/5504/94 Draft 4.
- EC (1996) Technical guidance document in support of the Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and the Commission Regulation (EC) 1488/94 on risk assessment for existing substances, parts I-IV. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- EC (2000) IUCLID dataset: substance ID 1506-02-1. 18. Feb. 2000, European Chemicals Bureau. 1-17.
- EC (2001) Richtlinie 2001/59/EG der Kommission vom 6. August 2001 zur 28. Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften vom 21. Aug. 2001*, L 225. 1-333.
- EC (2002) Guidance document on aquatic ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC. Working Document, Sanco/3268/2001 rev.4 (final). 1-62.
- EC (2003) Technical guidance document on risk assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market, parts I-IV. European Communities, EUR 20418 EN/1.
- EC (2004) EUSES - The European Union System for the Evaluation of Substances. Version 2.0, Jan. 2004. European Chemicals Bureau (EC, DGXI), Ispra, Italy (<http://ecb.jrc.it/existing-chemicals>).
- ECETOC (1993) Technical Report No. 56 - Aquatic toxicity data evaluation. ECETOC - European Centre for Ecotoxicology of Chemicals. Brussels. 1-66.
- ECETOC (1999) Technical Report No. 76 - Monitoring and modelling of industrial organic chemicals, with particular reference to aquatic risk assessment. ECETOC - European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. Brussels. 1-103.
- Egeler, P., Römbke, J., Meller, M., Knacker, T. & Nagel, R. (1999) Bioaccumulation test with tubificid sludgeworms in artificial media - development of a standardisable method. *Hydrobiologia*, **406**, 271-280.
- Egeler, P., Knacker, T., Römbke, J., Schallnaß, H.-J., Meller, M., Studinger, G., Franke, C. & Nagel, R. (2000) Proposal for a new guideline - bioaccumulation: sediment test using benthic oligochaetes. Submitted to OECD.
- Eisenhardt, S., Runnebaum, B., Bauer, K. & Gerhard, I. (2001) Nitromusk compounds in women with gynecological and endocrine dysfunction. *Environmental Research Section A*, **87**, 123-130.
- EMA (1997) Note for guidance: environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO-containing and immunological products. EMA/CVMP/055/96-Final. 1-42.
- EMA (1999a) Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines. Report and qualitative risk assessment by the CVMP. EMA/CVMP/342/99-corr-Final. 1-79.
- EMA (1999b) EMA Discussion paper on antimicrobial resistance. EMA/9880/99, Rev. 1. 1-4.

- EMA (2001) Discussion paper on environmental risk assessment of non-genetically modified organism (non-GMO) containing medicinal products for human use. CPMP - The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products - Evaluation of Medicines for Human Use. CPMP/SWP/4447/00 draft corr. 1-9.
- EMA (2002) Guideline on pre-authorisation studies to assess the potential for resistance resulting from the use of antimicrobial veterinary medicinal products. EMA/CVMP/244/01-Final-corr. 1-9.
- EMA (2003a). Note for guidance on environmental risk assessment of medicinal products for human use - Draft. CPMP/SWP/4447/00 draft. CPMP - The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products - Evaluation of Medicines for Human Use. 1-22.
- EMA (2003b) Environmental impact assessments (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) - Phase II. Draft. EMA/VCMP/790/03-Consultation. VICH Topic GL38. 1-33.
- Ericson, J.F., Länge, R. & Sullivan, D.E. (2002) Comment on "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance". *Environmental Science and Technology*, **36**, 4005-4006.
- Eschke, H.-D., Traud, J. & Dibowski, H.-J. (1994) Untersuchungen zum Vorkommen polycyclischer Moschus-Duftstoffe in verschiedenen Umweltkompartimenten. *UWSF - Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie*, **6**, 183-189.
- Fava, J.A., Adams, W.J., Larson, R.J., Dickson, G.W., Dickson, K.L. & Bishop, W.E. (1987) Research priorities in environmental risk assessment. 363.7 R432. Breckenridge, Colorado, SETAC - Society of Environmental Toxicology and Chemistry. SETAC Workshop Report. 1-103.
- Feijtel, T., Boeijs, G., Matthies, M., Young, A., Morris, G., Gandolfi, C., Hansen, B., Fox, K., Holt, M., Koch, V., Schroder, R., Cassani, G., Schowanek, D., Rosenblom, J. & Niessen, H. (1997) Development of a geography-referenced regional exposure assessment tool for European rivers - GREAT-ER. Contribution to GREAT-ER # 1. *Chemosphere*, **34**, 2351-2373.
- Fenske, M., van Aerle, R., Brack, S., Tyler, C.R. & Segner, H. (2001) Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **129**, 217-232.
- Fent, K. (1998) *Ökotoxikologie*. Stuttgart: Thieme. 1-288.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Lo Guidice, R., Pollio, A. & Garric, J. (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**, 359-370.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Guidice, R., Pollio, A., & Garric, J. (2004) Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 1344-1354.
- Feuerstein, T.J. & Jurna, I. (1996) Antikonvulsiva, Konvulsiva - Pharmakotherapie der Epilepsie. In *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Hrsg. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., & Starke, K., Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag. 263-273.
- Folmar, L.C., Hemmer, M., Hemmer, R., Bowman, C., Kroll, K. & Denslow, N.D. (2000) Comparative estrogenicity of estradiol, ethinyl estradiol and diethylstilbestrol in an *in vivo*, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquatic Toxicology*, **49**, 77-88.
- Fong, P.P., Huminski, P.T. & D'Urso, L.M. (1998) Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatulum*) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *Journal of Experimental Zoology A*, **280**, 260-264.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. & Starke, K. (1996) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 7. Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag. 1-981.
- Fromme, H., Otto, T. & Pilz, K. (2001) Polycyclic musk fragrances in different environmental compartments in Berlin (Germany). *Water Research*, **35**, 121-128.
- Gatermann, R., Hellou, J., Hühnerfuss, H., Rimkus, G.G. & Zitko, V. (1999) Polycyclic and nitro musks in the environment: a comparison between Canadian and European aquatic biota. *Chemosphere*, **38**, 3431-3441.
- Geyer, H.J., Rimkus, G., Wolf, M., Attar, A., Steinberg, P. & Kettrup, A. (1994) Synthetische Nitromoschus-Duftstoffe und Bromocyclen - Neue Umweltchemikalien in Fischen und Muscheln bzw. Muttermilch und Humanfett. *UWSF - Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie*, **6**, 9-17.
- Geyer, H.J., Rimkus, G.G., Scheunert, I., Kaune, A., Kettrup, A., Zeeman, M., Muir, D.C.G., Hansen, L.G. & Mackay, D. (2000) Bioaccumulation and occurrence of endocrine-disrupting chemicals (EDCs), persistent organic pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans. In *Bioaccumulation - New Aspects and Developments*. Ed. Beek, B., Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 1-166.
- Gies, A., Kolossa-Gehring, M., Roskamp, E. & Throl, C. (2001) Hormonell wirkende Chemikalien und Entwicklung der Spermienqualität beim Menschen. *Umweltmedizinischer Informationsdienst*, **2**, 7-9.

- Göbel, A., McArdell, C.S., Suter, M.J.-F. & Giger, W. (2004) Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **76**, 4756-4764.
- Goldzieher, J.W. (1989) Pharmacology of contraceptive steroids: a brief review. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **160**, 1260-1264.
- Grave, K., Lingaas, E., Bangen, M. & Rønning, M. (1999) Surveillance of the overall consumption of antibacterial drugs in humans, domestic animals and farmed fish in Norway in 1992 and 1996. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **43**, 243-252.
- Guengerich, F.P. (1990) Minireview - Metabolism of 17 α -ethynylestradiol in humans. *Life Sciences*, **47**, 1981-1988.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.-C. & Jørgensen, S.E. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. *Chemosphere*, **36**, 357-393.
- Halling-Sørensen, B., Holten Lützhøft, H.-C., Andersen, H.R. & Ingerslev, F. (2000) Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, **46**, 53-58.
- Hansch, C., Leo, A. & Hoekman, D. (1995) *Exploring QSAR. II - Hydrophobic, electronic, and steric constants*. Washington DC: American Chemical Society. 1-368.
- Hartig, C., Storm, T. & Jekel, M. (1999) Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **854**, 163-173.
- Hartmann, A., Chou, Y.-J. & Brich, Z. (2002) Assessing pharmaceuticals in the environment: an example for the EU. Proceedings of a multi-stakeholder workshop: assessment and management of PPCPs in the Canadian environment, held in Niagara-on-the-Lake, Ontario, 24-27 Feb. 2002.
- Heberer, T. (2002) Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, **131**, 5-17.
- Heberer, T., Gramer, S. & Stan, H.-J. (1999) Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part III: determination of synthetic musks in Berlin surface water applying solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, **27**, 150-156.
- Hilton, M.J. & Thomas, K.V. (2003) Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1015**, 129-141.
- Hirsch, R., Ternes, T.A., Haberer, K. & Kratz, K.-L. (1999) Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*, **225**, 109-118.
- Holt, M.S., Fox, K., Griebbach, E., Johnson, S., Kinnunen, J., Lecloux, A., Murray-Smith, R., Peterson, D.R., Schröder, R., Silvani, M., ten Berge, W.F.J., Toy, R.J. & Feijtel, T.C.M. (2000) Monitoring, modelling and environmental exposure assessment of industrial chemicals in the aquatic environment. *Chemosphere*, **41**, 1799-1808.
- Hopkins, M.N., Cunning, M., Wright, S.A., Lambert, A.H. & Trenchard-Morgan, S. (1996) 13-week oral (dietary) toxicity study of AHTN in the rat with a 4 week treatment free period. Quinteles Report RFA/6/95. Report to RIFM.
- Huang, C.H. & Sedlak, D.L. (2001) Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 133-139.
- Huber, M.M., Canonica, S., Park, G.-Y. & von Gunten, U. (2003) Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. *Environmental Science and Technology*, **37**, 1016-1024.
- Hutchinson, T.H. (2002) Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: *in vitro* and *in vivo* approaches. *Toxicology Letters*, **131**, 75-81.
- IEH (2003) *Information exchange and international co-ordination on endocrine disrupters*. MRC Institute for Environment and Health, Leicester, U.K.
- Ingersoll, C.G. & McDonald, D.D. (2001) A guidance manual to support the assessment of contaminated sediments in freshwater, estuarine, and marine ecosystems. British Columbia Ministry of Water, Land, and Air Protection - Pollution Prevention and Remediation Branch. Volume 3 – Interpretation of the results of sediment quality investigations. 1-225.
- Islinger, M., Willemski, D., Völk, A. & Braunbeck, T. (2003) Effects of ethinylestradiol on the expression of three estrogen-responsive genes and cellular ultrastructure of liver and testes in male zebrafish. *Aquatic Toxicology*, **62**, 85-103.
- Jobling, S. (1998) Review of suggested testing methods for endocrine-disrupting chemicals. *Pure & Applied Chemistry*, **70**, 1805-1827.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P. & Sumpter, J.P. (1996) Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**, 194-202.

- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. & Sumpter, J.P. (1998) Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology*, **32**, 2498-2506.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Braunbeck, T., Turner, A.P. & Tyler, C.R. (2004) Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology*, **66**, 207-222.
- Jørgensen, S.E. & Halling-Sørensen, B. (2000) Drugs in the environment. *Chemosphere*, **40**, 691-699.
- Jürgens, M.D., Holthaus, K.I.E., Johnson, A.C., Smith, J.J.L., Hetheridge, M. & Williams, R.J. (2002) The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 480-488.
- Kime, D.E. (1998) *Endocrine disruption in fish*. Kluwer Academic Publishers, Boston. 1-395.
- Klein, P., Serje, A. & Pezullo, J.C. (2001) Premature ovarian failure in women with epilepsy. *Epilepsia*, **42**, 1584-1589.
- Königstein, M., Larisch, M. & Obe, G. (1984) Mutagenicity of antiepileptic drugs. I. Carbamazepine and some of its metabolites. *Mutation Research*, **139**, 83-86.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. & Buxton, H.T. (2002a) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, **36**, 1202-1211.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. & Buxton, H.T. (2002b) Response to comment on "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance." *Environmental Science and Technology*, **36**, 4007-4008.
- Kopf, G. (1997) Wirkung endokriner Stoffe in Biotests mit Wasserorganismen. In *Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser*. Oldenbourg, München. 82-101.
- Kozak, R.G., D'Haese, I. & Verstraete, W. (2001) Pharmaceuticals in the environment: focus on 17 α -ethinylestradiol. In *Pharmaceuticals in the environment*. Ed. Kümmerer, K., Berlin, Heidelberg, New York: Springer. 49-65.
- Krämer, G., Besser, R. & Schlander, M. (1989) Carbamazepin: Nebenwirkungen und Toxizität. In *Carbamazepin in der Psychiatrie*. Hrsg. Müller-Oerlinghausen, B., Stuttgart, New York: Thieme. 233-243.
- Kuch, H.M. & Ballschmiter, K. (2001) Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environmental Science and Technology*, **35**, 3201-3206.
- Kukkonen, J.V.K. & Landrum, P.F. (1994) Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene to *Lumbriculus variegatus* (oligochaeta). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 1457-1468.
- Kuschinsky, G. & Lüllman, H. (1986) *Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 11. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 1-615.
- Kushner, E.J. (1976) On determining the statistical parameters for pollution concentration from a truncated data set. *Atmospheric Environment*, **10**, 975-979.
- LaFont, R. (2000) The endocrinology of invertebrates. *Ecotoxicology*, **9**, 41-57.
- Lagois, U. (1996) Vorkommen von synthetischen Nitromoschusverbindungen in Gewässern. *GWF Wasser, Abwasser*, **137**, 154-155.
- Lam, M.W., Young, C.Y., Brain, R.A., Johnson, D.J., Hanson, M.A., Wilson, C.J., Richards, S.M., Solomon, K.R. & Mabury, S.A. (2004) Aquatic persistence of eight pharmaceuticals in a microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 1431-1440.
- Länge, R., Hutchinson, T.H., Croudace, C.P., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G.H. & Sumpter, J.P. (2001) Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 1216-1227.
- Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998) Relative importance of ingested sediment and pore water as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*). *Environmental Science and Technology*, **32**, 1503-1508.
- Levy, S.B. (1997) Antibiotic resistance: an ecological imbalance. In *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*. Eds. Chadwick, D. J. & Goode, J. A., Chichester: Wiley. 1-14.
- Liebl, B. & Ehrenstorfer, S. (1993) Nitro musks in human milk. *Chemosphere*, **27**, 2253-2260.
- Löffler, D. & Ternes, T.A. (2003) Determination of acidic pharmaceuticals, antibiotics and ivermectin in river sediments using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1021**, 133-144.
- Löffler, D., Römbke, J., Meller, M. & Ternes, T.A. Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. Eingereicht bei *Environmental Science & Technology*, 10/2004.
- Mandell, G.L. & Petri, W.A. Jr. (1996) Antimicrobial agents – sulfonamides, trimethoprim-sulfamethoxazole, quinolones, and agents for urinary tract infections. In *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Eds. Hardman, J.G., Gilman, A.G., Limbird, L.E., Wonsiewicz, M.J. & McCurdy, P., New York: McGraw-Hill. 1057-1072.
- Matthiessen, P. (2000) Is endocrine disruption a significant ecological issue? *Ecotoxicology*, **9**, 21-24.

- McNamara, J.O. (1996) Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Eds. Hardman, J.G., Gilman, A.G., Limbird, L.E., Wonsiewicz, M.J., & McCurdy, P., New York: McGraw-Hill. 461-486.
- Meregalli, G. & Ollevier, F. (2001) Exposure of *Chironomus riparius* larvae to 17- α -ethynylestradiol: effects on survival and mouthpart deformities. *The Science of the Total Environment*, **269**, 157-161.
- Metcalf, C.D., Koenig, B.G., Bennie, D.T., Servos, M., Ternes, T.A. & Hirsch, R. (2003a) Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**, 2872-2880.
- Metcalf, C.D., Miao, X.-S., Koenig, B.G. & Struger, J. (2003b) Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental Toxicology & Chemistry*, **22**, 2881-2889.
- Miao, X.-S. & Metcalfe, C.D. (2003) Determination of carbamazepine and its metabolites in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **75**, 3731-3738.
- Miao, X.-S., Bishay, F., Chen, M. & Metcalfe, C.D. (2004) Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environmental Science and Technology*, **38**, 3533-3541.
- Midtvedt, T. (2001a) Antibiotics in the environment: zinc bacitracin - environmental toxicity and breakdown. In *Pharmaceuticals in the environment - sources, fate, effects and risks*. Ed. Kümmerer, K., Berlin: Springer. 77-79.
- Midtvedt, T. (2001b) The eco-shadow concept - a new way of following environmental impacts of antimicrobials. In *Pharmaceuticals in the environment - sources, fate, effects and risks*. Ed. Kümmerer, K., Berlin: Springer. 231-236.
- Molnár, J., Gazdag, M. & Szepesi, G. (1982) Determination of ethynylestradiol in tablets by quantitative TLC method. *Pharmazie*, **37**, 836-838.
- Morgan, J.E. & Morgan, A.J. (1998) The distribution and intracellular compartmentation of metals in the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa* sampled from an unpolluted and a metal-contaminated site. *Environmental Pollution*, **99**, 167-175.
- Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999) Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 1244-1249.
- Müller, S., Schmid, P. & Schlatter, C. (1996) Occurrence of nitro and non-nitro benzenoid musk compounds in human adipose tissue. *Chemosphere*, **33**, 17-28.
- Müller-Oerlinghausen, B. (1989) *Carbamazepin in der Psychiatrie*. Stuttgart: Thieme. 1-254.
- Mutschler, E. (1996) *Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. 1-991.
- Nash, J.P., Kime, D.E., van der Veen, L.T.M., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P. & Tyler, C.R. (2004) Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives*, **112**, 1725-1733.
- Nentwig, G., Oetken, M. & Oehlmann, J. (2004) Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates - The example of carbamazepine and clofibrac acid. In *Pharmaceuticals in the environment - sources, fate, effects and risks*. Ed. Kümmerer, K., Berlin: Springer. 195-208.
- Nipales, N.S., McArdell, C.S., Molnar, E. & Giger, W. (2000) Occurrence of macrolide and sulfonamide antibiotics in the aquatic environment of Switzerland. Ext. abstract for 219th ACS national meeting, March 2000, San Francisco, CA, USA.
- Nourypharma (2001) Neues bei Nourypharma - Arzneimittelwechselwirkungen, die die Sicherheit hormonaler Kontrazeptiva beeinträchtigen können. Nourypharma Informationsdienst. 1-3.
- Novartis (2000) Tegretol, carbamazepine USP, prescribing information. Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, New Jersey 07936. 1-16.
- OECD (1984a) OECD guideline for testing of chemicals - 201. Alga, growth inhibition test. 1-14.
- OECD (1984b) OECD guideline for testing of chemicals - 202. *Daphnia* sp., acute immobilisation test and reproduction test. 1-16.
- OECD (1984c) OECD guideline for testing of chemicals - 204. Fish, prolonged toxicity test: 14-day study. 1-9.
- OECD (1984d) OECD guideline for testing of chemicals - 209. Activated sludge, respiration inhibition test. 1-10.
- OECD (1992a) OECD guideline for testing of chemicals - 203. Fish, acute toxicity test. 1-9.
- OECD (1992b) OECD guideline for testing of chemicals - 210. Fish, early-life stage toxicity test. 1-18.
- OECD (1996) OECD guidelines for testing of chemicals - 305. Bioconcentration: flow-through fish test. 1-23.
- OECD (1998a) Fish embryo toxicity test with the zebrafish *Danio rerio*. OECD draft. In *UBA-Texte 58/98 - Ökotoxikologische Testverfahren mit aquatischen Organismen*. Umweltbundesamt, Berlin. 80-93.
- OECD (1998b) OECD guidelines for testing of chemicals - 211. *Daphnia magna* reproduction test. 1-21.
- OECD (2000a) OECD guideline for testing of chemicals - 215. Fish, juvenile growth test. 1-16.

- OECD (2000b) OECD guidelines for testing of chemicals - revised proposal for updating guideline 202. *Daphnia* sp., acute immobilisation test. 1-12.
- OECD (2001a) OECD guideline for the testing of chemicals. Draft proposal for a new guideline. 14-day fish assay for identification of potential endocrine disrupting chemicals. 1-15.
- OECD (2001b) OECD guidelines for the testing of chemicals - Proposal for a new guideline 218. Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment. 1-21.
- OECD (2002a) Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology. Detailed review paper - appraisal of test methods for sex hormone disrupting chemicals. ENV/JM/MONO(2002)8 - OECD Series on testing and assessment (21). 1-313.
- OECD (2002b) OECD guideline for testing of chemicals - 308. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediment systems. 1-19.
- OECD (2003) Test guidelines programme - final proposals for two new test guidelines: TG 218: Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment, TG 219: Sediment-water chironomid toxicity test using spiked water. ENV/JM/TG(2003)8. 1-62.
- Oehlmann, J., Bauer, B., Schulte-Oehlmann, U., Minchin, D., Fioroni, P. & Markert, B. (1999a) Intersex bei *Littorina littorea*: Biologisches Effektmontoring auf Tributylzinnverbindungen in deutschen Küstengewässern. In *Ökotoxikologie: ökosystemare Ansätze und Methoden*. Hrsg. Oehlmann, J. und Markert, B., Landsberg: ecomed. 364-375.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Tillmann, M., Oetken, M., Heim, M., Wilp, J. & Markert, B. (1999b) Endokrine Modulation durch Xenobiotika bei Mollusken - Möglichkeiten der Entwicklung eines Biotestsystems. In *Ökotoxikologie: ökosystemare Ansätze und Methoden*. Hrsg. Oehlmann, J. und Markert, B., Landsberg: ecomed. 546-558.
- Oehlmann, J. & Schulte-Oehlmann, U. (2003a) Endocrine disruption in invertebrates. *Pure & Applied Chemistry*, **75**, 2207-2218.
- Oehlmann, J. & Schulte-Oehlmann, U. (2003b) Molluscs as bioindicators: principles, concepts, and applications. In *Bioindicators and biomonitors*. Eds. Markert, B.A., Breure, A.M. and Zechmeister, H.G., Elsevier Science B.V., New York. 577-635.
- Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U. & Oehlmann, J. (2004) Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *International Review of Cytology*, **236**, 1-44.
- Oetken, M., Nentwig, G., Löffler, D., Ternes, T. & Oehlmann, J. Effects of the antiepileptic drug carbamazepine on aquatic invertebrates. *Eingereicht 2004*.
- Öllers, S., Singer, H.P., Fässler, P. & Müller, S.R. (2001) Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *Journal of Chromatography A*, **911**, 225-234.
- Offermanns, S. & Rosenthal, W. (2004) *Encyclopedic reference of molecular pharmacology*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. 1-1115.
- Orme, M.L., Back, D.J. & Breckenridge, A.M. (1983) Clinical pharmacokinetics of oral contraceptive steroids. *Clinical Pharmacokinetics*, **8**, 95-136.
- Osemwengie, L.I. & Gerstenberger, S.L. (2004) Levels of synthetic musk compounds in municipal wastewater for potential estimation of biota exposure in receiving waters. *Journal of Environmental Monitoring*, **6**, 533-539.
- OSPAR (2000) Draft OSPAR background document on musk xylene and other musks (presented by Switzerland - OSPARCOM 00/5/9).
- Papoulias, D.M., Noltie, D.B. & Tillitt, D.E. (2000) An *in vivo* model fish system to test chemical effects on sexual differentiation and development: exposure to ethinylestradiol. *Aquatic Toxicology*, **48**, 37-50.
- Pascoe, D., Carroll, K., Karntanut, W. & Watts, M.M. (2002) Toxicity of 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A to the freshwater cnidarian *Hydra vulgaris*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **43**, 56-63.
- Pascoe, D., Karntanut, W. & Müller, C.T. (2003) Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*, **51**, 521-528.
- Pawlowski, F. van Aerle, R., Tyler, C.R. & Braunbeck, T. (2004) Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **57**, 330-345.
- Peters, W., Walldorf, V. (1986) *Der Regenwurm - Lumbricus terrestris L.: Praktikumsanleitung*. Heidelberg, Wiesbaden: Quelle und Meyer. 1-174.
- Petersen, G.I., Andersen, L., Holbech, H. & Pedersen, K.L. (2000) Baseline test studies and development of ELISA. Eds. Andersen, L., Bengtsson, B.E., Björk, M., Gessbo, A., Holbech, H., Hylland, K., Norrgren, L., Pedersen, K.L., Lundgren, A., Petersen, G.I., Steinholz, A., and Örn, S., TemaNord 2000: 555, Copenhagen, Nordic Council of Ministers. 35-46.
- Petrovic, M., Solé, M., López de Alda, M.J. & Barceló, D. (2002) Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 2146-2156.

- Pfluger, P., Prietz, A., Wasserrab, B., Koster, C., Knörzer, B. & Dietrich, D. (2000) Untersuchungen zur aquatischen Toxizität und zur endokrinen Aktivität von Carbamazepin. Konstanz, EUREGIO Ökotoxikologie Service Labor, Universität Konstanz. 1-34.
- Pfluger, P., Wasserrab, B., O'Brien, E., Prietz, A., Spengler, P., Schneider, C., Heußner, A., Schmid, T., Knörzer, B., Metzger, J.W. & Dietrich, D.R. (2001) Entwicklung und Validierung von *in vitro* Prüfsystemen zum Nachweis von endokrin wirksamen Fremdstoffen: Chemisch-analytische Überprüfung und biologischer Nachweis von potentiell endokrin wirksamen Stoffen in Kläranlagenausläufen bzw. Vorflutern. Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS) - Abschlußbericht Förderkennzeichen: PAÖ Ö-98004. 1-165.
- Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. & Mattson, V.R. (1993) Use of the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12**, 269-279.
- Pickford, K.A., Thomas-Jones, R.E., Wheals, B., Tyler, C.R. & Sumpter, J.P. (2003) Route of exposure affects the oestrogenic response of fish to 4-tert-nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, **65**, 267-279.
- Pittenauer, E. (2002) Abbau und Verhalten von Arzneimittelwirkstoffen in der Umwelt. *Wiener Mitteilungen*, **178**, 17-33.
- Prento, P. (1994) Uptake and long-time storage of natural and synthetic dyes by earthworm chloragocytes. *In vivo* and *in vitro* investigations. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, **109**, 805-816.
- Purdum, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R. & Sumpter, J. (1994) Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology*, **8**, 275-285.
- Riedhammer, C. & Schwarz-Schulz, B. (2001) The newly proposed EU risk assessment concept for the sediment compartment. *Journal of Soils and Sediments*, **1**, 105-110.
- Rimkus, G.G. (1999) Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicology Letters*, **111**, 37-56.
- Rimkus, G.G. & Wolf, M. (1993) Rückstände und Verunreinigungen in Fischen aus Aquakultur. 2. Mitteilung: Nachweis von Moschus Xylol und Moschus Keton in Fischen. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **89**, 171-175.
- Rimkus, G.G. & Wolf, M. (1995) Nitro musk fragrances in biota from freshwater and marine environment. *Chemosphere*, **30**, 641-651.
- Rimkus, G.G. & Brunn, H. (1996) Synthetische Moschusduftstoffe – Anwendung, Anreicherung in der Umwelt und Toxikologie. Teil 1: Herstellung, Anwendung, Vorkommen in Lebensmitteln, Aufnahme durch den Menschen. *Ernährungs-Umschau*, **43**, 442-449.
- Rippen, G. (1990) Handbuch Umweltchemikalien: Stoffdaten, Prüfverfahren, Vorschriften. 51. Erg. Lfg. 5/2000. Landsberg/Lech: ecomed verlagsgesellschaft mbH.
- Römbke, J., Knacker, T. & Stahlschmidt-Allner, P. (1996) Umweltprobleme durch Arzneimittel – Literaturstudie. UBA-FB 96-060, UBA-Texte 60/96. Umweltbundesamt Deutschland, Berlin. 1-361.
- Römbke, J. & Moltmann, J. F. (1996) *Applied ecotoxicology*. Boca Raton: CRC/Lewis Publishers. 1-282.
- Rönnfahrt, I., Koschorreck, J. & Kolossa-Gehring, M. (2002) Arzneimittel in der Umwelt. *Mitteilungsblatt der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie*, **8** (4).
- Rooklidge, S.J. (2004) Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways. *The Science of the Total Environment*, **325**, 1-13.
- Rurainski, R.D., Theiss, H.J. & Zimmermann, W. (1977) Über das Vorkommen von natürlichen und synthetischen Östrogenen im Trinkwasser. *GWF - Wasser/Abwasser*, **118**, 287-291.
- Sabers, A. (1998) Teratogenic effects of old and new antiepileptic drugs. *Epilepsia*, **39** (S2), 45.
- Sacher, F., Lochow, E., Bethmann, D. & Brauch, H.-J. (1998) Vorkommen von Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächengewässern. *Vom Wasser*, **90**, 233-243.
- Sattelberger, R. (1999) Arzneimittelrückstände in der Umwelt. Bestandsaufnahme und Problemendarstellung. R-162, Umweltbundesamt Österreich, Umweltbundesamt GmbH, Wien. 1-122.
- Scholz, S. & Gutzeit, H.O. (2000) 17 α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, **50**, 363-373.
- Schowaneck, D. & Webb, S. (2002) Exposure simulation for pharmaceuticals in European surface waters with GREAT-ER. *Toxicology Letters*, **131**, 39-50.
- Schreurs, R.H.M.M., Legler, J., Artola-Garicano, E., Sinnige, T.L., Lanser, P.H., Seinen, W. & van der Burg, B. (2004) In vitro and in vivo antiestrogenic effects of polycyclic musks in zebrafish. *Environmental Science and Technology*, **38**, 997-1002.
- Schultz, I.R., Orner, G., Merdink, J.L. & Skillman, A. (2001) Dose-response relationships and pharmacokinetics of vitellogenin in rainbow trout after intravascular administration of 17 α -ethinylestradiol. *Aquatic Toxicology*, **51**, 305-318.
- Schultz, I.R., Skillman, A., Nicolas, J.-M., Cyr, D.G. & Nagler, J.J. (2003) Short-term exposure to 17 α -ethinylestradiol decreases the fertility of sexually maturing male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**, 1272-1280.

- Schwabe, U. & Paffrath, D. (2000) *Arzneiverordnungs-Report 1999. Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
- Schwabe, U. & Paffrath, D. (2003) *Arzneiverordnungs-Report 2002 - Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M. & Imboden, D.M. (2003) *Environmental organic chemistry*. Hoboken, NJ, USA: Wiley-Interscience. 1-1313.
- Schweinfurth, H., Länge, R., Miklautz, H. & Schauer, G. (1997) Umweltverhalten und aquatische Toxizität von Ethinylestradiol. In *Stoffe mit endokriner Wirkung im Wasser*. Hrsg. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, I. f. W. M., München & Wien: Oldenbourg. 39-54.
- Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M. & Wenzel, A. (2003a) Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54**, 302-314.
- Segner, H., Navas, J.M., Schäfers, C. & Wenzel, A. (2003b) Potencies of estrogenic compounds in *in vitro* screening assays and in life cycle tests with zebrafish *in vivo*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54**, 315-322.
- Seibert, H. (1996) Störungen der Entwicklung und Funktion des männlichen Reproduktionssystems. *UWSF - Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie*, **8**, 275-284.
- Seiler, J.P. (2002) Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology – can the two be connected? *Toxicology Letters*, **131**, 105-115.
- Seki, M., Yokota, H., Matsubaru, H., Tsuruda, Y., Maeda, M., Tadokoro, H. & Kobayashi, K. (2002) Effect of ethinylestradiol on the reproduction and induction of vitellogenin and testis-ova in medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 1692-1698.
- Sheahan, D.A., Bucke, D., Matthiessen, P., Sumpter, J.P., Kirby, M.F., Neall, P. & Walldock, M. (1994) The effects of low levels of 17 α -ethinylestradiol upon plasma vitellogenin levels in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* held at two acclimation temperatures. In *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Fishing News Books (FAO). Eds. Müller, R. & Lloyd, R., Oxford, UK: Blackwell. 99-112.
- Spacie, A. & Hamelink, J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 1163-1175.
- Stachel, B., Ehrhorn, U., Heemken, O.-P., Lepom, P., Reincke, H., Sawal, G. & Theobald, N. (2003) Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environmental Pollution*, **124**, 497-507.
- Stackelberg, P.E., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Henderson, A.K. & Reissman, D.B. (2004) Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *The Science of the Total Environment*, **329**, 99-113.
- Stan, H.-J. & Linkerhäger, M. (1992) Identifizierung von 2-(4-Chlorphenoxy)-2-methyl-propionsäure im Grundwasser mittels Kapillar-Gaschromatographie mit Atomemissionsdetektion und Massenspektrometrie. *Vom Wasser*, **79**, 85-88.
- Stan, H.-J., Heberer, T. & Linkerhäger, M. (1994) Vorkommen von Clofibrinsäure im aquatischen System – Führt die therapeutische Anwendung zu einer Belastung von Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser? *Vom Wasser*, **83**, 57-68.
- Steinberg, P., Fischer, T., Arand, M., Park, E., Elmadfa, I., Rimkus, G., Brunn, H. & Dienes, H.-P. (1999) Acute hepatotoxicity of the polycyclic musk 7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene (AHTN). *Toxicology Letters*, **111**, 151-160.
- Stephenson, J. (1972) *The Oligochaeta*. Historiae Naturalis Classica edition. New York: Verlag von J. Cramer. 1-978.
- Stumpf, M., Ternes, T.A., Haberer, K. & Baumann, W. (1996) Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser*, **87**, 251-261.
- Suedel, B.C., Boraczek, J.A., Peddicord, R.K., Clifford, P.A. & Dillon, T.M. (1994) Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **136**, 21-89.
- Tas, J.W., Balk, F., Ford, R.A. & van de Plassche, E.J. (1997) Environmental risk assessment of musk ketone and musk xylene in the Netherlands in accordance with the EU-TGD. *Chemosphere*, **35**, 2973-3002.
- Taylor, M.R. & Harrison, P.T.C. (1999) Ecological effects of endocrine disruption: current evidence and research priorities. *Chemosphere*, **39**, 1237-1248.
- Ternes, T.A. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, **32**, 3245-3260.
- Ternes, T.A. (2001) Pharmaceuticals and metabolites as contaminants of the aquatic environment. In *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: scientific and regulatory issues*. Eds. Daughton, C.G. & Jones-Lepp, T.L., Washington DC: American Chemical Society. 39-54.
- Ternes, T.A., Hirsch, R., Stumpf, M., Eggert, T., Schuppert, P. & Haberer, K. (1999a) Nachweis und Screening von Arzneimittlrückständen, Diagnostika und Antiseptika in der aquatischen Umwelt. Abschlussbericht des ESWE-Institutes für Wasserforschung und Wassertechnologie GmbH zum Forschungsvorhaben 02WU9567/3 des BMBF, März 1999. 1-234.

- Ternes, T.A., Stumpf, M., Müller, J., Wilken, R.-D., Haberer, K. & Servos, M. (1999b) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment*, **225**, 81-90.
- Ternes, T.A., Bonerz, M. & Schmid, T. (2001) Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **938**, 175-185.
- Ternes, T.A., Andersen, H., Gilberg, D. & Bonerz, M. (2002) Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry*, **74**, 3498-3504.
- Ternes, T.A., Stüber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M. & Teiser, B. (2003a) Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Research*, **37**, 1976-1982.
- Ternes, T.A., Knacker, T. & Oehlmann, J. (2003b) Körperpflegemittel in der aquatischen Umwelt - Eine bisher vernachlässigte Gruppe. *UWSF - Zeitschrift für Umweltchemie und Ökotoxikologie*, **15**, 169-180.
- Tixier, C., Singer, H.P., Öllers, S. & Müller, S.R. (2003) Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science and Technology*, **37**, 1061-1068.
- Tracey, G.A. & Hansen, D.J. (1996) Use of biota-sediment accumulation factors to assess similarity of nonionic organic chemical exposure to benthically-coupled organisms of differing trophic mode. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **30**, 467-475.
- Tyler, C.R., Jobling, S. & Sumpter, J.P. (1998) Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, **28**, 319-361.
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA) (1996) Ecological effects test guidelines – OPPTS 850.1350. Mysid chronic toxicity test – public draft. EPA 712–C–96–120. 1-8.
- U.S. Environmental Protection Agency (U.S.EPA) (2000) Computer Program: EPI-Suite Version 3.11 (<http://www.epa.gov/opptintr/exposure/docs/episuite.htm>).
- Valle, M., Örn, S., Holbech, H., Gessbo, Å. & Norrgren, L. (2001) Oral exposure in zebrafish; an alternative route of exposure to endocrine disrupting chemicals. In *Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals*. Eds. Petersen, G.I., Norrgren, L., Holbech, H., Lundgren, A., & Koivisto, S., Copenhagen: Nordic Council of Ministers. 42-47.
- van de Plassche, E.J. & Balk, F. (1997) Environmental risk assessment of the polycyclic musks AHTN and HHCB according to the EU-TGD. Report-No. 601503 008, Bilthoven, The Netherlands, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), BKH Consulting Engineers. 1-121.
- van Leeuwen, C.J. & Hermens, J.L.M. (1995) *Risk assessment of chemicals: an introduction*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher. 1-374.
- Vandenbergh, G.F., Adriaens, D., Verslycke, T. & Janssen, C.R. (2003) Effects of 17 α -ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54**, 216-222.
- Versnoken, B.J. & Janssen, C.R. (2004) Xenoestrogenic effects of ethinylestradiol in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, **19**, 198-206.
- VfA - Verband forschender Arzneimittelhersteller e.V. (2003) Statistics 2003 – Die Arzneimittelindustrie in Deutschland. Berlin. 1-66.
- Viganó, L., Arillo, A., Bottero, S., Massari, A. & Mandich, A. (2001) First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). *The Science of the Total Environment*, **269**, 189-194.
- Vogna, D., Marotta, R., Andreozzi, R., Napolitano, A. & d'Ischia, M. (2004) Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of antiepileptic drug carbamazepine. *Chemosphere*, **54**, 497-505.
- von Faber, H. & Haid, H. (1995) *Endokrinologie*. 4. Aufl., Stuttgart: Ulmer. 1-199.
- Wallace, J.B. & Webster, J.R. (1996) The role of macroinvertebrates in stream ecosystem function. *Annual Review of Entomology*, **41**, 115-139.
- Watts, M.M., Pascoe, D. & Carroll, K. (2001a) Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. *Water Research*, **35**, 2347-2352.
- Watts, M.M., Pascoe, D. & Carroll, K. (2001b) Chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A – effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Aquatic Toxicology*, **55**, 113-124.
- Watts, M.M., Pascoe, D. & Carrol, K. (2003) Exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A – effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54**, 207-215.
- Webb, S.F. (2001) A data-based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals. I – Collation of available ecotoxicity data. In *Pharmaceuticals in the environment - sources, fate, effects and risks*. Ed. Kümmerer, K., Berlin: Springer. 175-201.
- Weber, L.P., Balch, G.C., Metcalfe, C.D. & Janz, D.M. (2004) Increased kidney, liver, and testicular cell death after chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol in Medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 792-797.

- Wehner, R. & Gehring, W. (1990) *Zoologie*. 22. Aufl., Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. 1-816.
- Wenzel, A., Küchler, T., Henschel, K.-P., Schnaak, W., Diedrich, M. & Müller, J. (1998) Konzentrationen östrogen wirkender Substanzen in Umweltmedien. Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU), Forschungsbericht 297 65 001/11 (alt: 216 02 011/11), Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie (IUCT). 1-88.
- Wenzel, A., Schmitz, A., Schäfers, C. & Böhmer, W. (1999) Nebenwirkungen von Kontrazeptiva – Umweltrelevante Konzentrationen von Ethinylestradiol beeinträchtigen die Befruchtungsfähigkeit von Fischen. Jahresbericht 1999, IUCT - Fraunhofer Institut Umweltchemie und Ökotoxikologie. 49-52.
- Wenzel, A., Schäfers, C., Vollmer, G., Michna, H. & Diel, P. (2001) Research efforts towards the development and validation of a test method for the identification of endocrine disrupting chemicals. Contract B6-7920/98/000015, München, Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V. 1-82.
- Werner, J., Wautier, K., Evans, R.E., Baron, C.L., Kidd, K. & Palace, V. (2003) Waterborne ethinylestradiol induces vitellogenin and alters metallothionein expression in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquatic Toxicology*, **62**, 321-328.
- WHO Collaborating Centre (2003) WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Oslo. <http://www.whocc.no/atcddd/>
- Wiegel, S., Harms, H., Stachel, B. & Reincke, H. (2000) Synthetische Moschus-Duftstoffe in der Elbe. ARGE ELBE, Arbeitsgemeinschaft für die Reinhaltung der Elbe. Wassergütestelle Elbe, Hamburg. 1-120.
- Wiegel, S., Aulinger, A., Brockmeyer, R., Harms, H., Löffler, J., Reincke, H., Schmidt, R., Stachel, B., von Tümpling, W. & Wanke, A. (2004) Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere*, **57**, 107-126.
- Williams, C.L. & Stancel, G.M. (1996) Estrogens and progestins. In *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. Eds. Hardman, J.G., Gilman, A.G., Limbird, L.E., Wonsiewicz, M.J., & McCurdy, P., New York: McGraw-Hill. 1411-1440.
- Williams, R.J., Johnson, A.C., Smith, J.J.L. & Kanda, R. (2003) Steroid estrogens profiles along river stretches arising from sewage treatment works discharges. *Environmental Science and Technology*, **37**, 1744-1750.
- Wind, T., Werner, U., Jacob, M. & Hauk, A. (2004) Environmental concentrations of boron, LAS, EDTA, NTA and Triclosan simulated with GREAT-ER in the river Itter. *Chemosphere*, **54**, 1135-1144.
- Winkler, M., Kopf, G., Hauptvogel, C. & Neu, T. (1998) Fate of artificial musk fragrances associated with suspended particulate matter from the river Elbe in comparison to other organic contaminants. *Chemosphere*, **37**, 1139-1156.
- Wollenberger, L., Breitholtz, M., Kusk, K.O. & Bengtsson, B.-E. (2003) Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances. *The Science of the Total Environment*, **305**, 53-64.
- Wootton, R.J. (1984) *A functional biology of sticklebacks*. 1. edition. London, Sydney: Croom Helm. 1-265.
- Ying, G.G., Kookana, R.S. & Dillon, P. (2003) Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. *Water Research*, **37**, 3785-3791.
- Yu, Z., Xiao, B., Huang, W. & Peng, P. (2004) Sorption of steroid estrogens to soils and sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 531-539.
- Zehringer, M. & Herrmann, A. (2001) Analysis of polychlorinated biphenyls, pyrethroid insecticides and fragrances in human milk using a laminar cup liner in the GC injector. *European Food Research and Technology*, **212**, 247-251.
- Zillioux, E.J., Johnson, I.C., Kiparissis, Y., Metcalfe, C.D., Wheat, J.V., Ward, S.G. & Liu, H. (2001) The sheepshead minnow as an *in vivo* model for endocrine disruption in marine teleosts: a partial life-cycle test with 17 α -Ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 1968-1978.

8 Anhang

8.1	Ergänzende Informationen zu den ausgewählten Pharmaka	170
8.1.1	Carbamazepin	171
	Zusätzliche Informationen zu möglichen Nebenwirkungen	172
8.1.2	Sulfamethoxazol.....	173
8.1.3	17 α -Ethinylöstradiol.....	174
8.2	Literaturrecherche zu Umweltkonzentrationen der ausgewählten PPCPs	175
8.2.1	Bewertungsmuster der einzelnen Qualitätskriterien – Einteilung in drei Qualitätsstufen	175
8.2.2	Bewertung der recherchierten Quellen	177
8.3	Ergebnisse der Literaturrecherche zu Effektdaten der ausgewählten PPCPs	187
8.3.1	Effektdaten zu CBZ.....	187
8.3.2	Effektdaten zu SMX.....	199
8.3.3	Effektdaten zu EE2.....	199
8.3.4	Effektdaten zu AHTN.....	200
8.4	Rohdaten und statistische Auswertungen zu den durchgeführten Studien.....	201

8.1 Ergänzende Informationen zu den ausgewählten Pharmaka

Tab. 8.1: Substanzspezifische Parameter und physikalisch-chemische Eigenschaften der ausgewählten Substanzen.

Eigenschaft	Carbamazepin	Sulfamethoxazol	17 α -Ethinylöstradiol	Tonalid
CAS-Nummer	298-46-4	723-46-6	57-63-6	1506-02-1 21145-77-7
EINECS-Nummer	206-062-7	211-963-3	200-342-2	216-133-4 244-240-6
Chemischer Name	5 <i>H</i> -Dibenz[<i>b,f</i>]azepine-5-carboxamide	4-amino- <i>N</i> -(5-methyl-3-isoxazolyl)benzene sulfonamide	17 α -ethynyl-1,3,5[10]-estratriene-3,17b-diol	7-acetyl-1,1,3,4,4,6-hexamethyl-tetrahydro-naphthalene
IUPAC-Name	-	N1-(5-Methyl-3-isoxazolyl)-sulfanilamide	3-Hydroxy-19-nor-17a-pregna-1,3,5(10)-trien-20-in-17-ol	1-(5,6,7,8-tetrahydro-3,5,5,6,8,8-hexamethyl-2-naphthalenyl)-ethan-1-on
Andere Namen	Tegretol, Atretol, Depitol, viele andere	Gantanol, Sulfisomezole, Ro42130	17b-diol, viele andere	AHTN, Tetralide, Fixolide
Verordnungs-, Produktionsmengen [t/a]	87,6 t/a in D (2001) ^[11] ; 6334 kg in A 1997 ^[2] ; 268,1 t/a in EU (1999) ^[3] ; mindestens 1.000 t/a in EU produziert oder importiert ^[4]	53,6 in D (2001) ^[11] ; 0,963 in A (1997) ^[2] ; 4 in CH (1998) ^[5] ; zwischen 10 und 1.000 t/a in EU produziert oder importiert ^[4]	47,5 kg in D (2001) ^[11] ; 4 kg in A 1997 ^[2]	5.000-10.000 ^[6] ; 885 (EU, 1992), 585 (EU, 1995), 385 (EU, 1998) ^[7] ; 1.500 (weltw. 1999) ^[8] ; mind. 1.000 t/a in EU produziert o. import. ^[4]
Summenformel	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	C ₁₈ H ₂₆ O
Molekulargewicht M [g/mol]	236,28	253,31	296,4	258,4
Wasserlöslichkeit S [mg/L]	17,7 (25°C) ^[9]	610 (25°C) ^[9]	18,6 (pH 7) ^[10]	1,22 ^[11]
Dissoziationskonstante pK _a [-]	-	5,6 (25°C) ^[23]	10,46 (23°C) ^[10]	-
Oktanol-Wasser Verteilungskoeffiz. log K _{ow} [-]	2,45 (pH 7,4) ^[9]	0,89 ^{[9], [13]}	4,2 (pH 7) ^[10]	5,7 ^[7]
Adsorptionskoeffizient K _{oc} [L/kg]	3.871 (log K _{oc} = 3,588) (berechnet) ^[14]	1.531 (log K _{oc} = 3,185) (berechnet) ^[14]	47.660 (log K _{oc} = 4,678) (berechnet) ^[14]	55.176 (log K _{oc} = 4,74) ^[15]
pH	neutral	-	leicht sauer	neutral
Dampfdruck P (25°C) [Pa]	< 1 E-05 ^[16] ; 1,17 E-05 (berechn.) ^[14]	9,24 E-06 ^[9] ; 1,7 E-05 (berechn.) ^[14]	6 E-09 ^{[10], [17]} ; 2 E-05 ^[26]	0,0608 ^[15]
Henry-Konstante [-]	6,3 E-08 (berechn.) ^[18]	2,67 E-11 ^[9]	4 E-11 (berechn.) ^[10]	4,56 E-03 ^[15]
Hydrolyserate k _{OH} [1/M*s]	vernachlässigbar ^[14]	2 E-10 cm ³ /molecule*s (25°C) ^[geschätzt, 9]	vernachlässigbar ^[10]	-
photolytische Halbwertszeit t _{1/2}	geringer photolytischer Abbau (> 100 d) ^{[24], [25]}	t _{1/2} = 2,4 d ^[24]	vernachlässigbar ^[10] ; t _{1/2} > 10 d ^[19]	-
Bioabbaubarkeit	gemäß OECD 301 E kein signifikanter Abbau ^{zitiert in [16]} ;	gemäß OECD 301 D kein Abbau in 28 d; „nicht bioabbaubar“ ^[21]	„nicht bioabbaubar“ ^[10] ; Bioabbau aerob in nat. Flusswasser: t _{1/2} = 17 d ^[19] ; Bioabbau aerob in nat. Sediment: t _{1/2} = 81 d ^[22]	gemäß NEN 6515 (1989): 21% nach 21 d, „bedingt bioabbaubar“; gemäß MITI II: < 1% in 28 d, „nicht potentiell bioabbaubar“ ^[11] ; geringe Mineralisierung (ISO 10708)
Abbau in Kläranlagen	Beseitigung aus Abwasser (berechn.) ^[14] : Gesamt: 2,96% Bioabbau: 0,1% Schlammadsorption: 2,86% 7% Eliminierung in Kläranlagen ^[20] 8% Eliminierung in Kläranlagen ^[27]	Beseitigung aus Abwasser (berechn.) ^[14] : Gesamt: 1,88% Bioabbau: 0,09% Schlammadsorption: 1,79%	Beseitigung aus Abwasser (berechn.) ^[14] : Gesamt: 17,51% Bioabbau: 0,22% Schlammadsorption: 17,29%	Beseitigung aus Abwasser (berechn.) ^[14] : Gesamt: 93,19% Bioabbau: 0,77% Schlammadsorption: 92,41% Volatilisierung: 0,01%

[1] BLAC (2003); [2] Sattelberger (1999); [3] Ferrari et al. (2003); [4] European Commission – European Chemicals Bureau (ECB) (<http://ecb.ei.jrc.it/existing-chemicals/>) 03.Mai 2004; [5] Nipales et al. (2000); [6] EC (2000); [7] OSPAR (2000); [8] Steinberg et al. (1999); [9] SRC PhysProp Database (www.esc.syrres.com) (Zugriff 2003); [10] Schweinfurth et al. (1997); [11] Balk & Ford (1999a); [13] Hansch et al. (1995); [14] U.S.EPA (2000); [15] van de Plassche & Balk (1997); [16] Hartmann et al. (2002); [17] Kozak et al. (2001); [18] Berechnung nach Rippen (1990); [19] Jürgens et al. (2002); [20] Ternes (1998); [21] Al-Ahmad et al. (1999); [22] Ying et al. (2003); [23] Merck-Index (1999); [24] Andreozzi et al. (2003); [25] Doll & Frimmel (2003); [26] Christensen (1998); [27] Heberer (2002).

8.1.1 Carbamazepin

Epilepsie ist eine chronische neurologische Funktionsstörung, die ca. 0,6-0,8% der Bevölkerung weltweit betreffen (Offermanns & Rosenthal, 2004). Unter dem Oberbegriff Epilepsie steht eine heterogene Gruppe von Syndromen, welche durch eine gesteigerte Erregbarkeit zentraler Neurone und damit einer Erniedrigung der Krampfschwelle im kortikalen und subkortikalen motorischen System charakterisiert ist (Mutschler, 1996). Der Begriff Epilepsie bezieht sich dabei allerdings auf den chronischen Krankheitsverlauf, wobei ein einzelner Anfall nicht zwangsläufig die Diagnose der Epilepsie mit sich bringt.

Carbamazepin (CBZ) ist eines der wichtigsten Antiepileptika. Es wird bevorzugt bei psychomotorischen und Grand-mal-Anfällen eingesetzt, dient aber auch bei gemischten Anfallsleiden als Basistherapeutikum (Mutschler, 1996). Petit-mal-Anfälle scheinen mit CBZ nicht therapierbar zu sein (Novartis, 2000). Außer als Antiepileptikum wird CBZ bei Trigeminusneuralgie (Gesichtsschmerzen) und diabetischer Neuropathie verwendet. Wegen seines breiten Wirkprofils wird CBZ außerdem als Psychopharmakon eingesetzt: antineuralgisch, anxiolytisch, antiaggressiv und psychotrop (Manie, hohe Suizidalität).

Pharmakodynamik

Wirkungsmechanismen sind nur bei einem Teil der Antiepileptika genau bekannt. Von CBZ wird angenommen, dass es die posttetanische Potenzierung, d.h. die verstärkte Reizantwort nach wiederholter, rascher Reizung der Afferenzen, unterdrückt (Mutschler, 1996). In einer vom Hersteller herausgegebenen Verschreibungsinformation von ‚Tegretol‘ (Novartis, 2000), ein Pharmakon mit dem Wirkstoff CBZ, wird der Wirkungsmechanismus als noch immer unbekannt beschrieben. Feuerstein & Jurna (1996) beschreiben die Wirkung von CBZ in seinem Lehrbuch folgendermaßen: CBZ wirkt vorwiegend auf spannungsabhängige Na⁺-Kanäle und fördert deren Inaktivierung. Deshalb werden die Amplitude und die Dauer eines einzelnen Aktionspotenzials nicht reduziert, wohl aber die Fähigkeit der Neurone, Salven von hochfrequenten Aktionspotenzialen (z.B. 10 Hz) abzufeuern. Der Effekt ist umso deutlicher, je höher die Frequenz der Aktionspotenziale und je ausgeprägter die Depolarisation der Neurone ist, von der die hochfrequenten Aktionspotenziale ausgehen. Weniger frequente, von einem physiologischen Ruhe-Membranpotenzial ausgehende Aktionspotenziale, die eine normale Hirnfunktion widerspiegeln, werden kaum beeinflusst. Die Abhängigkeit von Ruhe-Membranpotenzial und Frequenz ist bei Phenytoin, Carbamazepin und Valproat etwas verschieden, und das dürfte ihre unterschiedliche klinische Wirksamkeit und ihr unterschiedliches Anwendungsspektrum miterklären.

Pharmakokinetik

Die Tagesdosis von CBZ variiert zwischen 0,3-1,6 g (Feuerstein & Jurna, 1996). Bei neurologischer oder psychiatrischer Behandlung kann die Dosis bis zu 2 g/d betragen (Krämer et al., 1989). Laut WHO beträgt die definierte Tagesdosis („*defined daily dose*“, DDD) 1 g/d (WHO Collaborating Centre, 2003). Der therapeutische Plasmaspiegel beträgt in der Monotherapie 7-15 µg/mL und in der Kombinationstherapie 2-6 µg/mL (Feuerstein & Jurna, 1996), kann aber Schwankungen von 0,5-25 µg/mL aufweisen (Novartis, 2000). Nebeneffekte auf das Zentralnervensystem treten häufig bei Plasmakonzentrationen von 9 µg/mL auf (McNamara, 1996). CBZ liegt im Blut zu 76% gebunden an Plasmaproteinen vor (Novartis, 2000). Die Plasmahalbwertszeit $t_{1/2}$ wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben. Nach Mutschler (1996) ist $t_{1/2} = 7-26$ h, nach Feuerstein & Jurna (1996) ist $t_{1/2} = 35$ h initial und 12 h nach erfolgter Enzyminduktion, in der bereits erwähnten Verschreibungsinformation beträgt $t_{1/2} = 25-65$ h initial und 12-17 h nach Enzyminduktion (Novartis, 2000). CBZ zählt zu den Enzyminduktoren des Phenobarbital-Typs. Nach Autoinduktion des Stoffwechsels (ca. 3-5 Wochen nach regelmäßiger Applikation) kann CBZ daher schneller eliminiert werden, aber auch andere Pharmaka, körpereigene Wirkstoffe (z.B. Steroidhormone) oder essentielle Substanzen (z.B. Vitamin D). Als ein wichtiger Nebeneffekt kann daher die Herabsetzung der Wirkung von oralen Kontrazeptiva auftreten (Mutschler, 1996). Nach oraler Verabreichung wird nur etwa 1-3% unverändert mit dem Urin ausgeschieden. CBZ wird in der Leber unter Beteiligung von Cytochrom P450 3A4 größtenteils zu dem noch wirksamen Carbamazepin-10,11-

epoxid metabolisiert (Mutschler, 1996; McNamara, 1996). Dieser Hauptmetabolit wird weiter zum inaktiven Diol und dessen Konjugaten biotransformiert. Die Plasmahalbwertszeit von Carbamazepin-10,11-epoxid beträgt 9 h.

Nebenwirkungen

Bei bis zu 30% der Patienten treten während der Einstellungsphase neurotoxische Nebenwirkungen auf, bei ca. 5% muss die Behandlung deswegen abgesetzt werden (Krämer et al., 1989). Die häufigsten reversiblen neurotoxischen Nebenwirkungen sind Schwindel und Ataxie, Sehstörungen, Müdigkeit, Kopfschmerz, Übelkeit und verlangsamte, undeutliche Sprache. Andere Nebenwirkungen unterschiedlicher Häufigkeit sind hämatologischer, hepatischer, endokriner und dermatologischer Art. Von diesen sind die häufigsten Blutbildveränderungen (bei ca. 10% vorübergehende und ca. 2% persistierende Leukopenie), Veränderungen der Leberfunktionswerte, Beeinflussung der Schilddrüsenfunktionsparameter T3, T4, TSH und FT4 und allergische Hautreaktionen unterschiedlichen Ausmaßes bei ca. 4-17% der Patienten. In mehreren Fällen waren die Nebenwirkungen letal (Krämer et al., 1989). CBZ kann fötale Schädigungen verursachen und darf deshalb während der Schwangerschaft nur unter größter Vorsicht und nach strenger Nutzen-Risiko-Abwägung verabreicht werden (Novartis, 2000). Für verschiedene Antiepileptika, darunter auch CBZ, wurde ein teratogenes Potenzial beim Menschen nachgewiesen (Sabers, 1998; Danielsson, 2000). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass bei Epileptikerinnen das Risiko teratogener Schädigungen ihrer Kinder ohnehin höher ist, als bei gesunden Frauen (Mutschler, 1996). Klein et al. (2001) stellten bei Epileptikerinnen frühzeitige Funktionsstörungen der Eierstöcke fest, ohne dabei einen signifikanten Einfluss von Antiepileptika nachweisen zu können. In Langzeitstudien mit Sprague-Dawley Ratten erwies sich CBZ als karzinogen in weiblichen Leberzellen und männlichen Testis (Novartis, 2000). Mutagenitäts-Studien mit Bakterien und Säugetieren ergaben negative Resultate. Die Bedeutung dieser Befunde für den Menschen ist bisher nicht geklärt (Novartis, 2000). Eine *in vitro*-Mutagenitäts-Studie (Königstein et al., 1984) mit humanen Lymphozyten mit CBZ und Epoxy-CBZ ergab negative Resultate.

Zusätzliche Informationen zu möglichen Nebenwirkungen

Auszug aus: Fachinformation: Novartis Pharma, Tegretal® 600 retard (Februar 2002 / MS 08/1.1 85351; Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V., FachInfo-Service, Postfach 12 55, 88322 Aulendorf.):

Nebenwirkungen

Die beobachteten Nebenwirkungen traten bei alleiniger Verabreichung von Carbamazepin (Monotherapie) seltener als bei gleichzeitiger Gabe anderer Antiepileptika (Kombinationstherapie) auf. Folgende Nebenwirkungen können dosisabhängig und insbesondere bei Behandlungsbeginn auftreten:

Zentralnervensystem/Psychie:

Häufig können Benommenheit, Schwindel, Somnolenz, Sedierung, Schläfrigkeit, Ataxie (ataktische und zerebellare Störungen), gelegentlich auch Kopfschmerzen, bei älteren Patienten Verwirrtheit und Unruhe (Agitation), auftreten. Im psychischen Bereich wurden vereinzelt depressive Verstimmungen, aggressives Verhalten, Denkerschwernis, Antriebsverarmung sowie Halluzinationen, Ohrensausen (Tinnitus) und Hyper- und Hypoakusis sowie Änderung der Wahrnehmung von Tonhöhen beobachtet. Unter der Behandlung mit Tegretal 600 retard können latente Psychosen aktiviert werden. Selten treten unwillkürliche Bewegungen, wie z.B. Asterixis, Ticks oder Nystagmus auf. Darüber hinaus können bei älteren und hirngeschädigten Patienten dyskinetische Störungen wie orofaziale Dyskinesien, Choreaathetose (unwillkürliche Bewegungen im Mund-Gesichts-Bereich wie Grimassieren, verschraubte Bewegungen) auftreten. Vereinzelt wurde über Sprechstörungen, Missempfindungen, Muskelschwäche, Nervenentzündung (periphere Neuritis) sowie Lähmungserscheinungen der Beine (Paresen) und Geschmacksstörungen berichtet. Die meisten dieser Erscheinungen verschwinden meist nach 8-14 Tagen von selbst oder nach vorübergehender Dosisverringerung wieder. Daher sollte das Arzneimittel möglichst einschleichend aufdosiert werden. Ein Kausalzusammenhang zwischen der Gabe von Carbamazepin und dem Auftreten eines malignen neuroleptischen Syndroms, besonders bei gleichzeitiger Gabe von Neuroleptika, kann nicht genau festgestellt werden.

Augen:

Vereinzelt treten Konjunktivitiden, gelegentlich vorübergehende Sehstörungen, wie z.B. Akkommodationsstörungen, Diplopie auf. Über Linsentrübung wurde berichtet.

Bewegungsapparatur:

Vereinzelt wurde über Arthralgien und Myalgien sowie Muskelkrämpfe berichtet. Nach Absetzen von Carbamazepin verschwanden diese Erscheinungen.

Haut, Schleimhäute, Gefäßsystem:

Gelegentlich bis häufig wird über allergische Hautreaktionen mit und ohne Fieber wie z. B. Urtikaria oder Pruritus sowie vereinzelt über exfoliative Dermatitis, Erythrodermie, Lyell- Syndrom, Photosensibilität, Erythema exsudativum multiforme et nodosum, Stevens- Johnson-Syndrom, Purpura, Lupus erythematoses disseminatus berichtet. Alopezie, Veränderungen der Hautpigmentation, Akne, Diaphoresis, Vaskulitis traten vereinzelt bis gelegentlich auf.

Blut- und Lymphsystem:

Gelegentlich bis häufig treten Blutbildveränderungen in Form von Leukozytose, Eosinophilie oder Leukopenie, Thrombozytopenie auf. Nach Literaturangaben tritt davon am häufigsten eine gutartige Leukopenie, in etwa 10% der Fälle vorüberge-

hend, in 2% persistierend, auf. Vereinzelt wurde über zum Teil lebensbedrohende Blutzellschäden wie Agranulozytose, aplastische Anämie, neben anderen Anämieformen (hämolytisch, megaloblastisch), und über Lymphadenopathie, Milzvergrößerung berichtet.

Gastrointestinal-Trakt:

Gelegentlich treten Appetitlosigkeit, Mundtrockenheit, Nausea und Vomitus, selten Diarrhöe oder Obstipation auf. Einzelfälle von Bauchschmerz sowie Schleimhautentzündungen im Mund-Rachen-Bereich (Stomatitis, Gingivitis, Glossitis) sind berichtet worden. Diese Erscheinungen klingen meist nach 8-14 Tagen von selbst oder nach vorübergehender Dosisreduzierung wieder ab (einschleichende Dosierung!). In der Literatur finden sich Hinweise, dass Carbamazepin möglicherweise eine Pankreatitis verursachen kann.

Leber und Galle:

Gelegentlich finden sich Veränderungen von Leberfunktionswerten, selten Ikterus, vereinzelt verschiedene Formen von Hepatitis (cholestatisch, hepatozellulär, granulomatös, gemischt).

Stoffwechsel (Wasser- und Mineralhaushalt), Hormonstatus:

Durch den antidiuretischen Effekt ist in seltenen Fällen Hyponatriämie mit gleichzeitigem Erbrechen, Kopfschmerz und vereinzelt mit Verwirrung aufgetreten. Einzelfälle von Ödemen und Gewichtszunahme wurden beobachtet. Carbamazepin kann den Serum-Kalziumspiegel durch beschleunigten Metabolismus des 25-OH-Cholecalciferols senken. Dies führte vereinzelt zu einer Osteomalazie. Vereinzelt wird über das Auftreten von Gynäkomastie und Galakthorrhöe sowie Hypercholesterinämie mit erhöhten HDL- und Triglyzeridwerten berichtet. Die Schilddrüsenfunktionsparameter T3, T4, TSH und FT4 können, insbesondere bei einer kombinierten Therapie mit anderen Antiepileptika, beeinflusst werden. In zwei Fällen wurde eine akute intermittierende Porphyrie ausgelöst.

Atmungsorgane:

Einzelfälle von Hypersensitivitätsreaktionen der Lunge mit Fieber, Dyspnoe und Pneumonitis oder Pneumonie (Alveolitis) und Lungenfibrose wurden in der Literatur beschrieben.

Urogenitaltrakt:

Selten treten Nierenfunktionsstörungen, die zum Teil auf den antidiuretischen Effekt von Carbamazepin zurückzuführen sind, wie z.B. Proteinurie, Hämaturie, Oligurie, sowie andere Symptome einer Nierenerkrankung, vereinzelt bis hin zu interstitieller Nephritis oder Nierenversagen, und andere Harnbeschwerden (Dysurie, Pollakisurie, Harnretention) auf. Weiterhin traten Einzelfälle sexueller Funktionsstörungen, wie z. B. Impotenz, verminderte Libido auf.

Herz- und Kreislauf-System:

Selten bis vereinzelt können Bradykardie und Herzrhythmusstörungen sowie Verschlechterung einer vorbestehenden koronaren Herzkrankheit und Herzinsuffizienz auftreten, insbesondere bei älteren Patienten oder Patienten mit bekannten Herzfunktionsstörungen. Selten tritt ein AV-Block, in Einzelfällen mit Synkopen sowie Hyper- oder Hypotonie auf. Besonders in hoher Dosierung kann Blutdruckabfall auftreten. Darüber hinaus wurde über Thrombophlebitis und Thromboembolie berichtet.

Überempfindlichkeitsreaktionen:

Selten sind verzögerte, mehrere Organsysteme betreffende Überempfindlichkeitsreaktionen mit Fieber, Hautausschlag, Vaskulitis, Lymphknotenschwellung, Gelenkschmerz, Leukopenie, Eosinophilie, Vergrößerung von Leber und Milz oder veränderten Leberfunktionswerten. Diese Erscheinungen können in verschiedenen Kombinationen auftreten und auch andere Organe wie Lunge, Niere, Bauchspeicheldrüse, Herzmuskel und Dickdarm betreffen. Vereinzelt wurden akute allergische Allgemeinreaktionen, aseptische Hirnhautentzündung mit Myoklonus und Eosinophilie, anaphylaktische Reaktionen und Angioödem beobachtet.

8.1.2 Sulfamethoxazol

Sulfamethoxazol (SMX) ist das wichtigste Antibiotikum unter den Sulfonamiden. Sulfonamide sind antibiotisch und chemotherapeutisch wirksame Amide der Sulfanilsäure. Das Wirkungsspektrum der ursprünglich gegen zahlreiche grampositive und einige gramnegative Erreger ist inzwischen durch Resistenzbildung sehr eingeschränkt. Gute Wirksamkeit besteht heute noch gegen Streptokokken, Pneumokokken, Aktinomyzeten, Nocardien und Chlamydien, teilweise auch gegen Meningokokken. Außerdem wirken Sulfonamide auch gegen einige Protozoen (Mutschler, 1996). Sulfonamide werden außer zur Behandlung von Menschen auch in der Tiermedizin und in beträchtlichem Umfang auch in der Fischzucht eingesetzt (Grave et al., 1999). Monotherapien werden heute mit Sulfonamiden nur noch selten durchgeführt. Sulfonamide werden teilweise im menschlichen Körper durch N-4-Acetylierung oder Oxidation metabolisiert bevor sie mit dem Urin ausgeschieden werden. Die Acetyl-derivate sind allerdings nicht mehr bakteriostatisch wirksam, schlechter löslich und toxischer als die unveränderten Sulfonamide (Mutschler, 1996). Wichtige Sulfonamide sind Sulfadiazin, Sulfasalazin und Sulfamethoxazol. SMX wird in der Humanmedizin meistens in Kombination mit Trimethoprim eingesetzt (Schwabe & Paffrath, 2000; vgl. Kap. 2.1.1).

Pharmakodynamik

Sulfonamide interferieren mit der Folsäuresynthese. Sie sind Strukturanaloga und kompetitive Antagonisten der *p*-Aminobenzoessäure, welche bei der Folsäuresynthese der Bakterien beteiligt ist. Folsäure ist sowohl bei den Säugetieren, als auch bei den Bakterien ein essentieller Metabolit, der bei der Biosynthese der Nucleinsäuren

eine wichtige Rolle spielt. Während die Säugetiere Folsäure mit der Nahrung aufnehmen können, sind die meisten Bakterien darauf angewiesen, diese zu synthetisieren (Mandell & Petri, 1996; Offermanns & Rosenthal, 2004). Für Tiere und Menschen sind Sulfonamide daher weitgehend untoxisch. Sulfonamide wirken somit nicht bakterizid, sondern bakteriostatisch, da der Mangel an *p*-Aminobenzoesäure zwar das Wachstum der Bakterien hemmt, diese aber nicht abtötet.

Pharmakokinetik

SMX gehört zu der Gruppe der Sulfonamide, die sowohl schnell im Magen-Darm-Trakt absorbiert (70-100%), als auch schnell eliminiert wird (Mandell & Petri, 1996). Die mittlere Tagesdosis von SMX beträgt 1,6-2,4 g (Mutschler, 1996), die von der WHO festgelegte DDD ist 2 g/d (WHO Collaborating Centre, 2003). Maximale therapeutische Plasmakonzentrationen betragen zwischen 100 und 200 mg/L und werden zwischen 2 h und 6 h nach der Einnahme erreicht. Die Plasmahalbwertszeit $t_{1/2}$ = 6-12 h (Mandell & Petri, 1996; Mutschler, 1996), die extrarenale Eliminationsfraktion von teils unveränderter, teils metabolisierter Substanz beträgt ca. 80% (Forth et al., 1996). Durch N-4-Acetylierung oder Oxidation werden die Sulfonamide im Organismus, hauptsächlich in der Leber, teilweise metabolisiert. Die Acetylderivate sind nicht mehr bakteriostatisch wirksam, schlechter löslich und toxischer als die unveränderten Sulfonamide (Mutschler, 1996). Auf Grund der schlechten Löslichkeit der acetylierten Form muss vor allem bei höherer Dosierung auf die Ausscheidung von Harnkristallen durch Ausbildung von Kristallurie geachtet werden.

Nebenwirkungen

Nebenwirkungen von Sulfonamiden sind zahlreich und verschiedenartig. Das Auftreten von unerwünschten Effekten liegt insgesamt bei ca. 5% der behandelten Patienten (Mandell & Petri, 1996). Relativ häufig sind gastrointestinale Beschwerden wie Appetitlosigkeit, Übelkeit und Brechreiz. Schwerwiegende, selten auftretende Überempfindlichkeitsreaktionen sind das Stevens-Johnsons- und das Lyell-Syndrom, ferner hämolytische Anämie und hämorrhagische Diathese (Mutschler, 1996). In Basisinformationen zu Präparaten verschiedener Hersteller werden Nebenwirkungen von Co-trimoxazol (SMX/Trimethoprim 5:1) folgendermaßen beschrieben: Allergische Reaktionen (Exantheme, Kopfschmerzen, Fieber, Gelenkschmerzen, Bindehautentzündungen und allergische Hautreaktionen, in seltenen Fällen schwerwiegende Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut wie Stevens-Johnsons- und Lyell-Syndrom), die Nieren betreffende Reaktionen (Nierenschädigung durch Auskristallisieren von schwer löslichen Sulfonamiden, Kristallurie), Knochenmarkschädigungen bei längerer Behandlung (diese können zu Blutbildstörungen führen), in seltenen Fällen Nebenwirkungen an der Leber (cholestatische Hepatose), Nebenwirkungen am Nervensystem (z.B. Halluzinationen und akute Psychosen). Ernste und lebensbedrohliche Nebenwirkungen treten häufiger bei älteren Patienten über 60 Jahren auf. In Zusammenhang mit Nebenwirkungen, die das blutbildende System betreffen und kutanen Nebenwirkungen wurden bereits Todesfälle beschrieben (<http://www.rote-liste.de>). Nebenwirkungen von Sulfonamiden betreffen somit verschiedenste Organbereiche des menschlichen Körpers, wie Haut und Muskelgewebe, Gastrointestinaltrakt, Urogenitaltrakt, Leber, Blut, Gefäße, Stoffwechsel, Nerven- und Immunsystem.

8.1.3 17 α -Ethinylöstradiol

Steroidhormone werden in endokrinen Drüsen synthetisiert und mit dem Blut meist an Proteinen gebunden in das Zielgewebe transportiert. Dort binden sie an spezifische Rezeptoren und lösen Veränderungen in der Gen-Expression aus, wodurch Stoffwechselprozesse, vor allem die Eiweißbiosynthese, beeinflusst werden. Steroidhormone lösen somit eine Vielzahl physiologischer Prozesse aus. Künstlich strukturmodifizierte Steroidhormone haben als Ovulationshemmer und als Anabolika, sowie als entzündungshemmende oder antiallergische Arzneimittel (Corticoide) pharmakologische Bedeutung. Das synthetische Steroidhormon 17 α -Ethinylöstradiol (EE2), ein 17-Ethinylderivat des Östradiols, gilt als das wichtigste kontrazeptive Östrogen und wird meist als Kombinationspräparat mit Gestagenen verabreicht.

Pharmakodynamik

EE2 ist wie die anderen Östrogene sehr lipophil und diffundiert passiv durch Zellmembranen, um daraufhin an den im Zellkern befindlichen Östrogenrezeptor zu binden. Östrogenrezeptoren finden sich in weiblichen Geschlechtsorganen, Brust, Hypophyse (Hirnanhangdrüse), Hypothalamus, Knochen, Leber und anderen Geweben, und in verschiedenen Geweben des Mannes (Williams & Stancel, 1996). Als Ovulationshemmer supprimiert es in erster Linie die Ausschüttung der hypothalamischen Gonadoreline und der hypophysären Gonadotropine.

Dadurch wird Follikelwachstum, Ovulation und Gelbkörperbildung gehemmt. Die Gestagenkomponente vermindert zusätzlich die Proliferation des Endometriums und steigert die Viskosität des Zervixschleims (Schwabe & Paffrath, 2000). Dadurch wird eine Pseudoschwangerschaft erzeugt und eine Befruchtung kann nicht mehr stattfinden.

Pharmakokinetik

EE2 ist bedingt durch die Ethinylsubstitution nicht dem „*first-pass-effect*“¹ und somit einer hepatischen Metabolisierung unterworfen (Williams & Stancel, 1996). Im Gegensatz hierzu beschreibt Goldzieher (1989) einen *first-pass-effect* bei EE2 von 52-62% und somit eine Bioverfügbarkeit von 38-48%. Durch die verzögerte Metabolisierung wird eine Wirkungssteigerung erreicht, weshalb EE2 ein hochpotentes Östrogen ist. Zum größten Teil liegt EE2 an Plasmaproteine, vor allem an Serum-Albumin gebunden vor (Orme et al., 1983; Williams & Stancel, 1996). Die Plasmahalbwertszeit $t_{1/2}$ variiert zwischen 6 und 20 h (Orme et al., 1983) und liegt im Durchschnitt bei 10 h (Goldzieher, 1989). Die Haupttransportformen von EE2 im Plasma sind 3-Sulfat- und teilweise auch 3-Glucuronid-Konjugate. Diese werden zum Teil über die Galle, aber auch über die Nieren ausgeschieden (Guengerich, 1990). Verschiedene Hydrolasen produzierende Darmbakterien (z.B. Clostridien) setzen allerdings das aktive, ungebundene EE2 wieder frei, welches dann schließlich rückresorbiert wird (enterohepatischer Kreislauf). Penicilline und Tetracycline können Clostridien abtöten, was diesen Kreislauf stört und somit zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von EE2 führt (Nourypharma, 2001). Quantitativ ist die 2-Hydroxylierung der wichtigste Stoffwechselweg von EE2. Das 2-Hydroxyderivat wird weiter methyliert, um dann als besser wasserlösliches Glucuronid mit Urin und Faeces im Verhältnis 6:4 ausgeschieden zu werden (Orme et al., 1983; Guengerich, 1990). Über den Anteil an unveränderter, bzw. bereits im Darm dekonjugierter Ausgangssubstanz liegen unterschiedliche Aussagen vor, wobei bis zu 10% unverändertes EE2 in Faeces und 1-16% in Urin festgestellt wurden (Orme et al., 1983).

Nebenwirkungen

Orale Kontrazeptiva wurden seit ihrer Einführung vor ca. 40 Jahren stets weiterentwickelt, um das Nebenwirkungsrisiko zu reduzieren. Verschiedene Nebenwirkungen wie Übelkeit, Gewichtszunahme, gastrointestinale Beschwerden, Kopfschmerzen und Hitzewallungen wurden registriert (von Faber & Haid, 1995). Die gefährlichsten aber seltenen Nebenwirkungen von Östrogenen und Kontrazeptiva waren die Bildung von Karzinomen und kardiovaskuläre Komplikationen in Form von Schlaganfällen, Herzinfarkten und Thromboembolien (Williams & Stancel, 1996; Schwabe & Paffrath, 2000). Daraufhin wurde zunächst das EE2 als Östrogenkomponente der Kontrazeptiva von 50 µg auf 20-30 µg pro Tag reduziert, und später ebenso die Gestagene. Das Risiko von Nebenwirkungen konnte so erheblich verringert werden (Schwabe & Paffrath, 2000). Die Möglichkeit der Entstehung von Karzinomen durch die Einnahme von Kontrazeptiva bleibt allerdings ein vieldiskutiertes Problem. 1936 wurde bereits in frühen Studien von Lacassagne bekannt, dass Östrogene in Tierversuchen Karzinome in Brust, Uterus, Testis, Knochen, Nieren und anderen Geweben auslösen kann (Williams & Stancel, 1996). Bis heute konnte allerdings noch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass Östrogene das Krebsrisiko beim Menschen erhöhen (von Faber & Haid, 1995).

8.2 Literaturrecherche zu Umweltkonzentrationen der ausgewählten PPCPs

8.2.1 Bewertungsmuster der einzelnen Qualitätskriterien – Einteilung in drei Qualitätsstufen

1. Was wurde analysiert? Details zur Probenaufbereitung sollten erläutert werden, um klarzustellen, ob es sich bei der analysierten Substanz um den in der Probe gelösten Teil, den an Schwebstoffen gebundenen Teil oder um die in der gesamten Matrix enthaltene Substanz handelt. Bei ausreichenden Angaben von Details wurde dieses Kriterium mit + bewertet, im Fall, dass das beprobte Kompartiment lediglich erwähnt wurde, wurde es mit 0 bewertet.
2. Analytische Methode: Die analytische Methode sollte im Detail erläutert oder zumindest eine entsprechende Referenz zitiert werden. Bei detaillierter Beschreibung der analytischen Methode wurde dieses Kriterium mit +

¹ Der „*first-pass-effect*“ beschreibt einen Prozess, wobei das Arzneimittel bereits bei der Passage durch die Schleimhaut und anschließend in der Leber enzymatisch inaktiviert wird, bevor es über den großen Kreislauf an den Wirkort gelangt.

bewertet, bei kurzer Erläuterung ohne Details wurde 0 zugeteilt und im Fall, dass die Methode nicht erwähnt wurde, ein -.

3. Angabe der Einheiten: Die Konzentrationseinheiten müssen genannt sein und eventuelle Normalisierungen auf z.B. Kohlenstoff- oder Lipidgehalt müssen spezifiziert werden. Wurden die Einheiten genannt, so wurde dem Kriterium ein + zugeteilt, anderenfalls ein -.

4. Bestimmungsgrenze: Wurde die BG oder zumindest die NG angegeben und definiert, so wurde dem Kriterium ein + zugeordnet, waren die Angaben unvollständig (z.B. nur für eine von mehreren untersuchten Substanzen) wurde die 0 zugeteilt, und ein -, falls hierzu keine Angaben gemacht wurden.

5. Konzentration der Blindproben: Wurden die Konzentrationen der Blindproben angegeben wurde ein + zugeteilt, wurden Blindproben gemessen ohne die Resultate anzugeben wurde die 0 zugeteilt, und wurden keine Angaben hierzu gemacht wurde ein - zugeteilt.

6. Wiederfindungsrate: Wurden relative bzw. absolute Wiederfindungsraten angegeben und lagen im Bereich von 70-150%, so wurde dem Kriterium ein + zugeteilt. Lag die Wiederfindungsrate außerhalb diesen Bereichs wurde eine 0 zugeteilt, und ein - wurde zugeteilt, wenn keine Angaben zur Wiederfindungsrate gemacht wurden.

7. Reproduzierbarkeit: Um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten sollten Vertrauensbereiche und Standardabweichungen von Wiederholungen einzelner Analysen angegeben werden. Wurden diese Informationen angegeben wurde ein +, anderenfalls ein - zugeteilt.

8. Probenahme: Waren definierte und standardisierte Probenahmebedingungen gegeben, so wurde dem Kriterium ein + zugeteilt, wurden die Probenahme ohne nähere Beschreibung kurz erläutert, so wurde eine 0 zugeteilt, und waren die Bedingungen gar nicht genannt, so wurde ein - zugeteilt.

9. Schema/Häufigkeit der Probenahme: Wurde bei der Planung des Probenahmeschemas die Heterogenität der Probenmatrix berücksichtigt, um repräsentative Resultate zu gewährleisten, wurde dem Kriterium ein + zugeteilt. War der Umfang der Proben nicht ausreichend, so wurde eine 0 zugeteilt, und wurden keine Angaben zu Häufigkeit und Umfang der Proben gemacht, so wurde dem Kriterium ein - zugeteilt.

10. Ort der Probenahme: Wurde der Ort der Probenahme präzise beschrieben und war die Lage repräsentativ für das entsprechende Kompartiment und Expositionsszenarium gewählt, so wurde dem Kriterium ein + zugeteilt, bei ungenauen Angaben eine 0, und falls keine Angaben zur Örtlichkeit vorhanden waren ein -.

11. Datum der Probenahme: Wurde das exakte Datum oder der Messzeitraum angegeben, so wurde diesem Kriterium ein + zugeteilt, wurde lediglich das Jahr angegeben wurde eine 0 zugeteilt, und war keine Angabe des Zeitpunkts der Probenahme vorhanden ein -.

12. Charakterisierung des untersuchten Kompartiments: Wurden Angaben zu Kompartimentcharakteristika (z.B. TOC-Gehalt, Schwebstoffgehalt, pH, Temperatur, Partikelgröße, Lipidgehalt oder ähnliches) gemacht, wurde dem Kriterium ein + zugeteilt, anderenfalls ein -.

13. Nähe zu Eintragsquellen (Anteil an geklärtem Abwasser): Wurde die Nähe zu Eintragsquellen berücksichtigt und die Entfernung des Probenahmeortes zur nächstgelegenen Kläranlage angegeben, oder besser noch der Anteil an geklärtem Abwasser im untersuchten Oberflächengewässer, so wurde ein + zugeteilt, anderenfalls ein -.

14. Statistische Auswertung: Wurde eine statistische Auswertung durchgeführt und detailliert dokumentiert (z.B. Median, 90. Perzentil, Anzahl der Proben < BG) so wurde das Kriterium mit einem + versehen. Waren solche Auswertungen nur unvollständig dokumentiert oder z.B. nicht für alle Substanzen und Kompartimente der Untersuchung durchgeführt, so wurde eine 0 vergeben, und wurden nur einzelne herausragende Werte angegeben, wie z.B. Maximalkonzentrationen, so wurde ein - zugeteilt.

15. Konzentrationen < BG: Wurde eine Aussage darüber getroffen, ob die analysierten Proben mit Konzentrationen < BG in die statistische Auswertung mit einbezogen wurden, und wurde der Wert der ihnen dabei zugeteilt wurde angegeben, so wurde das Kriterium mit einem + versehen, anderenfalls mit einem -.

Im Kriterienkatalog des TGD werden weitere Qualitätskriterien genannt, welche in der hier durchgeführten Auswertung allerdings nicht berücksichtigt wurden:

16: Die Exaktheit und Richtigkeit (im TGD genannt „accuracy“, Akkuratess) wird sichergestellt durch die Analyse von „Standard Referenzproben“. Solche Referenzproben, welche eine bekannte und definierte Menge der untersuchten Substanz enthalten, werden z.B. bei der Analyse von Pestiziden eingesetzt, sind allerdings für Pharmaka in wässrigen Proben derzeit nicht erhältlich. Aus diesem Grund wurde dieses Kriterium bei der hier durchgeführten Auswertung außer Acht gelassen.

17: Der Umfang und das Emissionsschema des Substanzintrags können für die Bewertung im lokalen Maßstab von entscheidender Bedeutung sein. Dabei ist es wichtig zu betrachten, ob ein konstanter, kontinuierlicher Eintrag in die Umwelt stattfindet, oder ob die Freisetzung der Substanz ein diskontinuierliches Muster aufweist. Dies trifft allerdings vor allem auf Industriechemikalien und Pestizide zu, im Falle der Pharmaka ist eine Abschätzung des lokalen Eintrags in die Umwelt sehr schwierig, da Verschreibungsdaten meist auf nationaler Ebene

ne erfasst werden. Das Emissionsschema der Pharmaka stellt mit Ausnahme eines zu erwartenden erhöhten Eintrags über Krankenhäuser und Hospitäler ein eher diffuses über die gesamte Bevölkerung verteiltes Muster dar.

18: Die Strömung und Verdünnungsrate bei Eintrag in Fließgewässer ist ebenso für die Bewertung im lokalen Maßstab von Bedeutung. Da allerdings, wie bereits erwähnt, für Pharmaka ein diffuser Eintrag zu erwarten ist und eine Auswertung auf nationaler Ebene erfolgte, wurde dieses Kriterium nicht berücksichtigt. Die Applikationsrate ist im Wesentlichen für die Betrachtung von Böden bei der Bewertung von Pestiziden von Bedeutung.

8.2.2 Bewertung der recherchierten Quellen

Quellen zu Carbamazepin

Ternes, 1998 (CBZ-1):

Ternes (1998) veröffentlichte eine sehr umfangreiche Arbeit über das Vorkommen von 32 Pharmakarückständen in Abwässern und Oberflächengewässern in Deutschland. Insgesamt wurden die Zu- und Abläufe von 49 Kläranlagen auf die Substanzen hin analysiert. Dabei wurden von einer Kläranlage zeitlich korrelierende Tagesmischproben über 6 Tage lang während mehrerer Probenahmekampagnen in den Jahren 1996 und 1997 untersucht. Zusätzlich wurden von mehreren deutschen Fließgewässern Tagesmischproben und Stichproben analysiert. Die angewendeten analytischen Methoden wurden ausführlich in zuvor veröffentlichten Artikeln beschrieben. Wichtige analytische Parameter wie Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungsraten wurden angegeben. Die Bedingungen der Probenahmen und das Probenahmeschema wurden sehr detailliert beschrieben. Eine statistische Auswertung wurde durchgeführt und die Ergebnisse wie Anzahl der Messungen oberhalb der Nachweisgrenze, Median und 90. Perzentil wurden berichtet. Durch die Erfüllung nahezu aller oben formulierten Qualitätskriterien wird ein insgesamt verlässliches und repräsentatives Bild über das Vorkommen der analysierten Substanzen in den untersuchten Kompartimenten geschaffen, weshalb die Daten für die Expositionsabschätzung als uneingeschränkt gültig klassifiziert wurden (Tab. 8.2).

Tab. 8.2: Auswertung von Referenzen mit Daten zu Oberflächenwasserkonzentrationen von CBZ und SMX nach in Kap. 3.2.1 beschriebenem Schema.

Kriterium	Referenzen zu CBZ							
	CBZ-1	CBZ-2	CBZ-3	CBZ-4	CBZ-5	CBZ-6	CBZ-7	CBZ-8
1. Was wurde analysiert	+	+	+	+	+	+	+	+
2. Analytische Methode	+ ¹	+	+	+	+ ⁴	+ ¹	+ ¹	+
3. Einheiten	+	+	+	+	+	+	+	+
4. Bestimmungsgrenze	+	0	+	+	+	+	+	+
5. Blindproben	- ¹	-	-	-	- ⁴	+	+ ¹	0
6. Wiederfindungsrate	+ ¹	0 ²	+	+	- ⁴	+ ¹	+ ¹	+
7. Reproduzierbarkeit	+ ¹	-	+	+	- ⁴	+ ¹	+ ¹	+
8. Probenahme	+	+	+	+/-	+	+	+	-
9. Schema und Häufigkeit	+	+	0	0/-	+	+	+	-
10. Ort der Probenahme	+	+	+	+	+	+	+	+
11. Datum der Proben	+	+	+	+	+	+	+	+
12. Charakterisierung der (des) Kompartimente(s)	0	0	-	-	-	+	0	-
13. Nähe zu Eintragsquellen	-	+	-	-	0	+	+	+
14. Statistik	+	+	+	-	+	0	0	-
15. Konzentrationen < BG	-	-	-	-	-	0	-	-
Anzahl +	11	9	10	8/9	9	13	12	9
Anzahl 0	1	3	1	0/1	1	2	2	1
Anzahl -	3	3	4	5/7	5	0	1	5
Bewertungskategorie ³	1	2	1	2	1	1	1	2

¹: Analytische Methode wurde in vorangegangenen Publikationen detailliert beschrieben,

²: Wiederfindungsrate wurde nur bei einer von 13 untersuchten Substanzen angegeben,

³: gemäß Beschreibung in Kap. 3.2.1,

⁴: Verweis auf Referenzen, in denen die Methode beschrieben ist, jedoch wurden keine Angaben zu den eigenen Ergebnissen bezüglich dieser Qualitätskriterien gemacht.

Pfluger et al., 2001 (CBZ-2):

Pfluger et al. (2001) veröffentlichten den Abschlussbericht einer auf Landesebene durchgeführten Studie, deren Zielsetzung die Entwicklung und Validierung von *in vitro*-Prüfsystemen zum Nachweis von endokrin wirksamen Fremdstoffen war. Dabei wurden ein Kläranlagenauslauf und verschiedene Vorfluter, welche in den Bodensee münden, chemisch analytisch auf endokrin wirksame Substanzen und Pharmakarückstände untersucht. Die analytische Methode ist ausführlich beschrieben, allerdings wurden wichtige Qualitätsparameter wie Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungsraten nur teilweise oder überhaupt nicht angegeben. Die Probenahme beschränkte sich auf 6 Einzelproben, welche über einen Zeitraum von einem Jahr entnommen wurden, sowie Tagesmischproben über einen Zeitraum von einer Woche. Eine Charakterisierung der beprobten Kompartimente wurde vorgenommen indem Angaben über Temperatur, pH-Wert und Flussrate der Vorfluter gemacht wurden. Da wichtige Qualitätsparameter zur analytischen Methode nur unzureichend angegeben wurden, wurde die Arbeit nach dem vom TGD vorgeschlagenen Kriterienkatalog als „mit Beschränkung für die Expositionsabschätzung gültig“ kategorisiert (Tab. 8.2).

Sacher et al., 1998 (CBZ-3):

Eine sehr umfangreiche Untersuchung über das Vorkommen von 13 Arzneimittelwirkstoffen in Oberflächengewässern mit Schwerpunkt auf der analytischen Methodik, die ausführlich beschrieben ist und hohe Standards erfüllt. Die Ergebnisse werden umfassend dargestellt, allerdings fehlen detaillierte Beschreibungen des Schemas und Häufigkeit der Probenahme. Die sehr umfangreiche Beprobung verschiedener Flüsse über einen Zeitraum von 2 Jahren (1996-97) schafft allerdings eine repräsentative Übersicht über die regionale Exposition der untersuchten Substanzen in deutschen Gewässern. Deshalb wurde diese Referenz der Kategorie 1 zugeordnet („ohne Beschränkung für Expositionsabschätzung gültig“) (Tab. 8.2).

Öllers et al., 2001 (CBZ-4):

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung einer Methode zur simultanen quantitativen Bestimmung von neutralen und sauren Pharmazeutika und Pestiziden in Oberflächengewässern und Kläranlagenabläufen. Die analytische Methodik wird sehr detailliert und präzise beschrieben und erfüllt nahezu alle vom TGD geforderten Qualitätskriterien. Die in der Schweiz durchgeführte Probenahme von Seewasser wird allerdings nur am Rande erwähnt. Das Schema und die Häufigkeit der Probenahme von Flusswasser und Kläranlagenabläufen werden leider gar nicht beschrieben, somit wird nicht klar, ob z.B. Einzelproben oder Mischproben genommen wurden. Eine statistische Auswertung der Resultate wird nicht dargestellt. Minimal- und Maximalwerte werden angegeben, nicht aber der Median oder 90. Perzentil, weshalb die Verwendung der Daten in der Expositionsabschätzung problematisch ist. Die Beschreibung und Durchführung der chemischen Analyse erfüllt einen sehr hohen Qualitätsstandard, allerdings wird die Repräsentativität durch fehlende Angaben zur Probenahme reduziert, weshalb die Arbeit entsprechend den Qualitätskriterien des TGD als „nicht uneingeschränkt gültig für die Expositionsabschätzung“ eingestuft wurde (Tab. 8.2).

Wiegel et al., 2004 (CBZ-5):

Darstellung der Ergebnisse einer sehr umfangreichen Messkampagne, im Rahmen derer verschiedene Humanpharmaka (u. a. CBZ und SMX) einschließlich mehrerer Metabolite in der Elbe und in einigen ihrer Zuflüsse nachgewiesen wurden. Die Messkampagne verlief insgesamt über einen Zeitraum von mehreren Jahren. Das Vorkommen von CBZ wurde besonders intensiv in über 100 Wasserläufen in Sachsen während des Zeitraums zwischen Jan. und Dez. 2002 untersucht. Die angewendeten analytischen Methoden wurden im Rahmen dieser Publikation nur beiläufig erwähnt. Für weitere Details wurde auf andere Publikationen bzw. auf einen umfangreichen Bericht über diese Messkampagne verwiesen, in denen die entsprechenden Verfahren und Methoden beschrieben sind. Angaben zu einigen Qualitätskriterien, wie z.B. Wiederfindungsraten und Reproduzierbarkeit wurden dort nicht gemacht. Da es sich hierbei um die bei weitem umfangreichsten veröffentlichten Messdaten zum Vorkommen von CBZ in der aquatischen Umwelt mit über 1800 Einzelmessungen handelt, und die verwendete Messmethode dem zur Zeit höchstem verfügbaren technischen Stand entspricht, werden die Ergebnisse als repräsentativ für deutsche Oberflächengewässer betrachtet und daher in die Bewertungskategorie 1 eingestuft.

Stackelberg et al., 2004 (CBZ-6):

Stackelberg et al. (2004) beschreiben sehr detailliert eine Monitoringstudie zu dem Vorkommen von 106 organischen Fremdstoffen in Flusswasser und Rohwasser zur Trinkwassergewinnung, welches aus diesen Gewässern

hergestellt wird. Zum Nachweis der Substanzen wurden verschiedene Verfahren verwendet, die in vorangegangenen Publikationen beschrieben und validiert wurden. Insgesamt wurden 12 Proben untersucht, wobei die Proben des Oberflächengewässers aus Mischproben von 10 vertikalen Profilen bestanden. Die Beprobungen wurden nach einem von dem *U.S. Geological Survey* beschriebenen standardisierten Verfahren durchgeführt und protokolliert. Die beprobten Trinkwasseraufbereitungsanlagen wurden namentlich nicht genannt, jedoch wurden die Bedingungen der umgebenden Fließgewässer (z.B. Fließgeschwindigkeit, Anteil an geklärtem Abwasser) und die unterschiedlichen Aufbereitungsstufen der Wasserbehandlung mit deren beprobten Stationen ausführlich erläutert. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurde nicht dargestellt, allerdings wurden die Einzelmesswerte in einem logarithmischen Diagramm dargestellt und die Nachweisfrequenz und die maximalen Messwerte im fertigen Trinkwasser aufgelistet. Die im TGD genannten Qualitätskriterien wurden somit nahezu im vollen Umfang erfüllt, weshalb die Daten in die Bewertungskategorie 1 eingeteilt wurde.

Metcalf et al., 2003b (CBZ-7):

Metcalf et al. (2003b) präsentieren Messergebnisse aus Oberflächengewässern im Bereich der Großen Seen in Canada aus unterschiedlich mit geklärtem Abwasser kontaminierten Bereichen. Stichproben aus Flüssen und Seen wurden jeweils im Sommer während zwei Messkampagnen in den Jahren 2000 und 2002 entnommen und mit mehreren Messmethoden auf verschiedene Humanpharmaka analysiert. Die analytischen Verfahren werden kurz erläutert und in vorangegangenen Publikationen detailliert beschrieben und validiert. Die Probenahmeorte sind ausführlich beschrieben und in einer Landkarte gekennzeichnet. Eine statistische Auswertung unter Angabe der Anzahl von Messungen oberhalb der Nachweisgrenze, Maximalkonzentrationen und Mediane wurde durchgeführt. Dabei wurden allerdings in die Berechnung der Mediane lediglich die Messwerte oberhalb der Nachweisgrenze einbezogen, weshalb diese Werte unkorrekt und für eine Expositionsabschätzung nicht verwendet werden sollten. Für eine „worst-case-Betrachtung“ können die Maximalwerte jedoch durchaus herangezogen werden, da nahezu alle sonstigen Qualitätskriterien des TGD erfüllt wurden.

Miao & Metcalfe, 2003 (CBZ-8):

Sehr ausführliche Beschreibung der Entwicklung einer analytischen Methode zum Nachweis von CBZ in Abwasser und Oberflächenwasser. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden Proben von Kläranlagenzulauf und -ablauf sowie Wasser aus dem Fluss Otonabee in Canada untersucht. Die Probenahmeorte werden kurz beschrieben, allerdings werden keine Angaben zur Methode der Probenahme bzw. zur deren Anzahl und Häufigkeit gemacht. Anhand der Ergebnisdarstellung zeigt sich aber, dass jeweils nur eine Probe entnommen und dreifach analysiert wurde. Auf Grund dieser geringen Probenzahl ist die Repräsentativität der Proben erheblich reduziert, weshalb die Daten in die Bewertungskategorie 2 eingestuft wurden.

Quellen zu Sulfamethoxazol

Hirsch et al., 1999 (SMX-1):

Die in der Studie angewendete analytische Methode und entsprechende Qualitätsmerkmale werden nur kurz erläutert, es wird allerdings auf einen zuvor veröffentlichten Artikel verwiesen, in dem die Methodik unter Einhaltung der vom TGD geforderten Qualitätskriterien sehr ausführlich beschrieben ist. In dieser Abhandlung über das Verhalten von Antibiotika in der Umwelt werden mögliche durch Antibiotika verursachte Effekte auf die Umwelt unter Berücksichtigung von Metabolisierung diskutiert. Ergänzend werden Angaben über Verschreibungsmengen gemacht. Leider wurden lediglich Stichproben genommen, wobei die Beschreibung der Probenahme und des Zeitpunktes nur marginal oder überhaupt nicht erwähnt werden. Der Probenahmeort wurde exemplarisch in einem Fall beschrieben. Allerdings führt die hohe Anzahl an Einzelproben und eine übersichtliche statistische Auswertung zu einem guten Überblick über das Vorkommen von diversen Antibiotika in der aquatischen Umwelt, weshalb die Arbeit der Bewertungskategorie 1 zugeteilt wurde (Tab. 8.3).

Kolpin et al., 2002a (SMX-2):

Eine sehr umfangreiche Studie über das Vorkommen von Pharmakarückständen in U.S.-amerikanischen Flüssen mit ausführlicher Beschreibung der analytischen Methoden und diesbezüglichen Qualitätskriterien. Wasserproben von 139 Flüssen wurden über einen Zeitraum von 2 Jahren analysiert (1999-2000), allerdings wurde dabei jeder Fluss nur einmal beprobt, weshalb zeitliche Variationen nicht berücksichtigt werden konnten. Der Vorgang der Probenahme wurde nach standardisierten Einheitsprotokollen durchgeführt, wobei jeweils Mischproben aus verschiedenen Bereichen der Flussläufe entnommen wurden. Die Probenahmeorte werden nicht im Einzelnen angegeben, allerdings wird auf eine Internetseite verwiesen, wo entsprechende Informationen erhältlich sind.

Obwohl jedes Gewässer nur einmal beprobt wurde, schafft die große Anzahl an beprobten Gewässern eine sehr gute Momentanaufnahme des Gewässerzustandes bezüglich der Belastung mit Pharmakarückständen. Die Ergebnisse der Messungen von SMX-Konzentrationen dieser Studie wurde somit in die Bewertungskategorie 1 eingeteilt (Tab. 8.3).

Tab. 8.3: Auswertung von Referenzen mit Daten zu Oberflächenwasserkonzentrationen von CBZ und SMX nach in Kap. 3.2.1 beschriebenem Schema.

Kriterium	Referenzen zu SMX						
	SMX-1	SMX-2	SMX-3	SMX-4	SMX-5	SMX-6	SMX-7
1. Was wurde analysiert	+	+	+	+	+	+	+
2. Analytische Methode	+ ¹	+	+	+ ¹	0 ²	+	+ ¹
3. Einheiten	+	+	+	+	+	+	+
4. Bestimmungsgrenze	+	+	+	+	+	+	+
5. Blindproben	- ¹	+	+	- ¹	- ²	+	+
6. Wiederfindungsrate	- ¹	+	+	+	- ²	+	+ ¹
7. Reproduzierbarkeit	- ¹	+	+	+	- ²	+	+ ¹
8. Probenahme	-	+	0	+	+	0	+
9. Schema und Häufigkeit	-	0	-	+	0	-	+
10. Ort der Probenahme	0	0	-	+	+	0	+
11. Datum der Proben	-	+	-	+	+	-	+
12. Charakterisierung der (des) Kompartimente(s)	-	-	-	0	-	-	+
13. Nähe zu Eintragsquellen	-	0	-	+	0	-	+
14. Statistik	+	+	-	+	0	0	0
15. Konzentrationen < BG	-	-	-	+	0	0	0
Anzahl +	5	10	7	13	6	7	13
Anzahl 0	1	3	1	1	5	4	2
Anzahl -	9	2	7	1	4	4	0
Bewertungskategorie ³	1	1	2	1	1	2	1

¹: Analytische Methode wurde in vorangegangenen Publikationen detailliert beschrieben.

²: Verweis auf Referenzen, in denen die Methode beschrieben ist, jedoch wurden keine Angaben zu den eigenen Ergebnissen bezüglich dieser Qualitätskriterien gemacht.

³: gemäß Beschreibung in Kap. 3.2.1.

Hilton & Thomas, 2003 (SMX-3):

Detaillierte und sorgfältige Beschreibung der analytischen Nachweismethode verschiedener Humanpharmaka in britischen Kläranlagenabläufen und Oberflächengewässern. Allerdings werden keine Angaben zur Häufigkeit und Anzahl der Probenahmen bzw. Probenahmeort- und Datum gemacht. Insofern kann keine Aussage zur Repräsentativität der Probenahme gemacht werden, weshalb die gemessenen SMX-Konzentrationen gemäß den beschriebenen Kriterien als nicht adäquat zur Verwendung in der Umweltrisikobewertung eingeteilt wurden.

Ashton et al., 2004 (SMX-4):

Die angewendete analytische Methode wird in dieser Arbeit nur knapp beschrieben, jedoch wird auf eine vorangegangene Arbeit verwiesen, in welcher die Methode unter Berücksichtigung der im TGD genannten Qualitätskriterien detailliert aufgeführt ist (Hilton & Thomas, 2003). Schwerpunkt der Beprobung waren Kläranlagenabläufe im Südosten Englands, jedoch wurden auch Stichproben von Flusswasser analysiert. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurde unter Berücksichtigung der Konzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze durchgeführt, die 90. Perzentile wurden dabei allerdings nicht angegeben. Als bisher einzige Arbeit wurde ergänzend zur Ausgangssubstanz SMX der Metabolit Acetyl-SMX analysiert. Obwohl in Kläranlagenabläufen SMX in einer Maximalkonzentration von 132 ng/L gemessen wurde, konnte das Antibiotikum in 15 Proben von Flusswasser unterhalb und oberhalb der beprobten Kläranlagenabläufe nicht nachgewiesen werden. Trotz der relativ geringen Anzahl an analysierten Proben aus Oberflächengewässern wurden die Daten als adäquat zur Verwendung in der Expositionsabschätzung beurteilt.

Wiegel et al., 2004 (SMX-5):

Siehe auch Kommentare zu CBZ-5.

Das Vorkommen von SMX wurde allerdings im Gegensatz zu CBZ im Rahmen einer wesentlich kleineren Messkampagne im April 1998 untersucht, in der Proben von verschiedenen Entnahmeorten entlang der Elbe untersucht wurden. Eine statistische Auswertung wurde hierbei nicht durchgeführt, jedoch wurden alle Einzelmesswerte angegeben. Ebenso wie die Daten zum Vorkommen von CBZ wurden die gemessenen SMX-Konzentrationen als adäquat zur Verwendung in der Expositionsabschätzung eingestuft.

Hartig et al., 1999 (SMX-6):

Sehr ausführliche Beschreibung einer Methodenentwicklung zum analytischen Nachweis von Sulfonamiden in gereinigtem Abwasser von Kläranlagen. Alle im TGD genannten Qualitätskriterien bezüglich der chemischen Analytik wurden in ausreichendem Masse erfüllt. Allerdings wurden keine Angaben zu den Probenahmen (Methode bzw. Schema und Häufigkeit) der Stichproben aus Kläranlagenablauf und aus Oberflächengewässern gemacht. Lediglich 5 Messwerte zu Einzelproben von 5 verschiedenen Probenahmeorten werden angegeben. Auf Grund der dadurch bedingten verminderten Repräsentativität der Proben wurden die Daten in die Bewertungskategorie 2 eingeteilt.

Stackelberg et al., 2004 (SMX-7):

Siehe Kommentare zu CBZ-6.

Quellen zu 17 α -Ethinylöstradiol

Wenzel et al., 1998 (EE2-1):

Wenzel et al. (1998) erstellten den Abschlussbericht einer sehr umfangreichen Studie über das Vorkommen von östrogen wirksamen Substanzen in verschiedenen Umweltkompartimenten, welche im Auftrag des Deutschen Umweltbundesamtes durchgeführt wurde. Die analytischen Methoden sind sehr ausführlich beschrieben. Proben wurden unter standardisierten Bedingungen aus Oberflächengewässern, Kläranlagenabläufen und Klärschlämmen, natürlichen Sedimenten, Sickerwässern aus Kompost- und Deponieanlagen und Gülle entnommen. Das sehr umfangreiche Probenahmeschema liefert einen weit reichenden Überblick über das Vorkommen von EE2 in verschiedenen Kompartimenten in mehreren deutschen Bundesländern. Die Abwässer von Kläranlagen wurden bezüglich ihres Gehalts an kommunalen, industriellen und Abwässern von Krankenhäusern und Hospitälern unterschieden. Leider wurden in die statistische Auswertung lediglich die positiven Befunde oberhalb der Bestimmungsgrenze in die Berechnungen von Median und Minimalwert einbezogen. Wenn man berücksichtigt, dass in nur ca. 10% der Proben von Kläranlagenabläufen und Oberflächengewässern EE2 nachgewiesen wurde, so würde ein Außerachtlassen der Konzentrationen < BG bei den statistischen Berechnungen, also der Proben, in denen kein EE2 nachgewiesen werden konnte, zu einer Überschätzung des EE2-Vorkommens in den entsprechenden Kompartimenten führen. Da alle Einzelwerte im Anhang des Berichts aufgeführt wurden, konnte eine Korrektur der statistischen Berechnungen von Median und 90. Perzentil vorgenommen werden. Dabei wurden die Konzentrationen < BG gemäß Kushner (1976) und wie in der überarbeiteten Version des TGD vorgeschlagen (EC, 2003) gleich dem halben Wert der BG gesetzt. Die korrigierten Werte sind in Tab. 3.2 in Klammern unter den Originalwerten angegeben. Da die Durchführung der Studie unter Einhaltung höchster Qualitätsstandards durchgeführt wurde, wurden die (korrigierten) Werte als „uneingeschränkt für die Expositionsabschätzung gültig“ in Bewertungskategorie 1 eingestuft (Tab. 8.4).

Belfroid et al., 1999 (EE2-2):

Das Ziel dieser Arbeit von Belfroid et al. (1999) war die Entwicklung einer sensitiven analytischen Methode zum Nachweis von Östrogenen in Abwässern und Oberflächengewässern in Konzentrationen bis unterhalb von 1 ng/L. Das sehr aufwändige und präzise durchgeführte analytische Verfahren ist sehr gut beschrieben. Zusätzlich wurden als Konjugate gebundene Östrogene erfasst, indem die Proben zuvor enzymatisch behandelt und somit Konjugate aufgespaltet wurden. Die Probenahmeorte waren über die ganzen Niederlande verteilt, wo Stichproben aus Kläranlagenabläufen und Flüssen entnommen wurden. Die Analyse wurde mittels GC-MS/MS durchgeführt, somit wurden die Daten Bewertungskategorie 1 zugeordnet (Tab. 8.4).

Stumpf et al., 1996 (EE2-3):

Die analytische Methode wird in der Arbeit von Stumpf et al. (1996) ausführlich unter Einhaltung aller vom TGD geforderten Qualitätskriterien beschrieben. Außer Stichproben und Mischproben von Kläranlagenabläufen wurden aus verschiedenen Oberflächengewässern mit einer automatisierten Probenahmeverrichtung entnommene Stichproben analysiert, vom Rhein wurden dabei Proben über einen Zeitraum von 14 Tagen entnommen. Das Datum der Probenahme wurde allerdings nur für die Proben der Oberflächengewässer angegeben. Leider wurde der Nachweis von EE2 in den Proben mit einfacher MS geführt, weshalb die Daten in die Bewertungskategorie 2 eingeteilt wurden (Tab. 8.4).

Pfluger et al., 2001 (EE2-4):

Siehe Kommentare zu CBZ-2.

Adler et al., 2001 (EE2-5):

Diese sehr umfangreiche Studie von Adler et al. (2001) über das Vorkommen von Östrogenen in verschiedenen aquatischen Kompartimenten in Süddeutschland berücksichtigte ebenso wie Belfroid et al. (1999) das potenzielle Vorhandensein von Konjugaten, weshalb Teilproben vor der Analyse enzymatisch behandelt wurden. Die analytische Methode ist ausführlich unter Erfüllung der Qualitätskriterien beschrieben. Die Proben waren Zufallsstichproben, wodurch die Repräsentativität der gemessenen Konzentrationen in Kläranlagenzuläufen und -abläufen herabgesetzt ist. Von Oberflächengewässern und Grundwässern wurde eine große Anzahl an Proben analysiert, was für diese Kompartimente ein repräsentatives Bild über das Vorkommen der analysierten Substanzen schafft. Das Datum der Probenahme wurde nicht angegeben. Leider wurde die Analyse mit einfacher MS durchgeführt, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass vor allem die hohen EE2-Konzentrationen in Grund- und Trinkwasser durch das oben beschriebene Phänomen der Überlagerung der *peaks* zustande kam. Deshalb wurden die Daten konsequenterweise in Bewertungskategorie 2 eingeteilt (Tab. 8.4).

Tab. 8.4: Auswertung von Referenzen mit Daten zu Oberflächenwasserkonzentrationen von EE2 nach in Kap. 3.2.1 beschriebenem Schema.

Kriterium	Referenzen zu EE2 (EE2-1 bis EE2-13)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Was wurde analysiert	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. Analytische Methode	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
3. Einheiten	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4. Bestimmungsgrenze	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5. Blindproben	-	-	+	-	-	- ¹	0	+	+	+	-	0	-
6. Wiederfindungsrate	+	+	+	0	+	- ¹	+	+	+	+	+	+	-
7. Reproduzierbarkeit	+	+	+	-	+	- ¹	+	+	+	+	+	+	-
8. Probenahme	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	+
9. Schema und Häufigkeit	+	+	+	+	0	0	+	0	+/0	0	+	+	+
10. Ort der Probenahme	+	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+
11. Datum der Proben	+	+	0	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12. Charakterisierung der (des) Kompartimente(s)	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0	0	+	-
13. Nähe zu Eintragsquellen	+	+	-	+	-	-	-	0	+	+	+	+	-
14. Statistik	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	0	-	0
15. Konzentrationen < BG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0
Anzahl +	12	11	11	9	9	5	11	10	10/11	11	10	12	7
Anzahl 0	0	1	1	3	1	3	1	3	2/1	3	4	2	3
Anzahl -	3	3	3	3	5	7	3	2	3	0	1	1	5
Bewertungskategorie ²	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2

¹: Analytische Methode wurde in vorangegangenen Publikationen detailliert beschrieben,

²: gemäß Beschreibung in Kap. 3.2.1.

Aherne & Briggs, 1989 (EE2-6):

Diese Arbeit ist eine kurze Schilderung der Ergebnisse des Nachweises von EE2 in Kläranlagenabläufen, Oberflächen- und Trinkwasser. Der Nachweis wurde mittels „Immunoassay“ geführt. Diese Methode wird in einer zitierten zuvor veröffentlichten Publikation näher erläutert. Die Probenahmeprozedur, das Probenahmeschema und die Anzahl der gemessenen Proben sind nicht näher beschrieben, wodurch die Repräsentativität der Ergebnisse herabgesetzt ist. Angegeben sind lediglich Maximalwerte, eine statistische Auswertung wird nicht präsentiert. Die Qualitätskriterien sind daher allgemein nur unzureichend erfüllt, weshalb die Daten der Bewertungskategorie 2 zugeordnet wurden (Tab. 8.4).

Ternes et al., 1999b (EE2-7):

Ziel dieser sehr umfangreichen Arbeit war es, die Konzentrationen mehrerer Östrogene in verschiedenen Kläranlagenabläufen in Deutschland, Kanada und Brasilien zu bestimmen und zu vergleichen. Zu diesem Zweck wurden zeitlich korrelierende Proben aus Kläranlagenzuläufen und -abläufen mit einer automatisierten Probenahmeverrichtung entnommen. Durch die Anwendung einer standardisierten analytischen Methode konnte die Effizienz der Elimination mittels verschiedener Klärtechniken bewertet und verglichen werden. Zusätzlich wurden bei dieser Studie Proben aus deutschen Oberflächengewässern analysiert. In diesen 15 Stichproben konnte bei einer Bestimmungsgrenze von 0,5 ng/L keine Kontamination mit EE2 nachgewiesen werden. Ein wesentlicher Beitrag dieser Studie war die Feststellung, dass bei der Detektion von EE2 mit einfacher MS die Gefahr der Überschätzung der EE2-Konzentration durch das oben beschriebene Phänomen der Interferenzen im Spektrogramm mit einer unbekannten Substanz besteht. Auf Grund der Einhaltung der meisten und wichtigsten Qualitätskriterien des TGD-Katalogs wurden die Daten dieser Arbeit der Bewertungskategorie 1 zugeordnet (Tab. 8.4).

Kolpin et al., 2002a (EE2-8):

Trotz der zuvor beschriebenen Einteilung der Studie bzw. deren Daten in Bewertungskategorie 1 (s. Kommentare zu SMX-3) lassen die sehr hohen in Oberflächengewässern gemessenen Konzentrationen von EE2 vermuten, dass hierbei bereits erwähnte Interferenzen beim Nachweis von EE2 mittels einfacher MS auftraten. In einer Antwort der Autoren (Kolpin et al., 2002b) zu einem Kommentar zu dieser Studie (Ericson et al., 2002) wurden zwar die zunächst sehr hohen EE2-Konzentrationen korrigiert, sie liegen jedoch auch nach dieser Korrektur um ca. 1-2 Größenordnungen höher als alle anderen hier ausgewerteten Publikationen zu EE2-Konzentrationen in Oberflächengewässern. Auf Grund dieser Interferenzen und der Bestimmung der EE2-Konzentrationen mit einfacher MS wurden die Daten dieser Arbeit zu EE2-Konzentrationen in die Bewertungskategorie 2 eingeteilt (Tab. 8.4).

Petrovic et al., 2002 (EE2-9):

Die in dieser Arbeit angewendeten analytischen Methoden sind sehr detailliert beschrieben und erfüllen die vom TGD erforderten Qualitätskriterien. Die untersuchten Kläranlagen sind ausführlich charakterisiert und die Standorte der Probenahmeorte von Oberflächenwasser sind in Bezug zu ihrer Nähe zu den nächstgelegenen Kläranlagen ausreichend beschrieben. Informationen zur Verdünnungsrate von geklärtem Abwasser in Oberflächengewässern werden gegeben. Die Probenahmeprozedur wird allerdings nur kurz erwähnt, wobei von Oberflächengewässern nur Stichproben entnommen wurden. Leider werden die Ergebnisse der Messungen von Zu- und Abläufen der Kläranlagen nur als Konzentrationsbereich angegeben, ohne dabei die Gesamtanzahl der Proben oder die Anzahl der gemessenen Replikate zu nennen. Die Ergebnisse der EE2-Messungen in Oberflächengewässern werden lediglich in Balkendiagrammen ohne den zugehörigen Werten angegeben; eine statistische Auswertung wurde nicht durchgeführt. Da somit die Repräsentativität der Ergebnisse reduziert ist, und der Nachweis von EE2 mit einfacher MS geführt wurde, konnten die Daten dieser Arbeit nur in Bewertungskategorie 2 eingeteilt werden (Tab. 8.4).

Kuch & Ballschmiter, 2001 (EE2-10):

Diese Arbeit von Kuch & Ballschmiter (2001) beschreibt sehr detailliert die analytische Methodik unter Einhaltung hoher Qualitätsstandards. Die Konzentrationen der Blindproben werden hier, als eine der wenigen Ausnahmen der ausgewerteten Publikationen, genannt, was gerade bei Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze von großer Bedeutung ist. Die Probenahmeprozedur, bei der Stichproben von Kläranlagenabläufen und Oberflächengewässern genommen wurden, ist allerdings nur beiläufig erwähnt. Als Minimalkonzentrationen werden Werte genannt, die oberhalb der Nachweisgrenze liegen, obwohl in nur ca. 50% der Proben EE2 nachgewiesen

werden konnte. Daher ist nicht offensichtlich, ob die Konzentrationen $< BG$ in der statistischen Auswertung berücksichtigt wurden oder nicht. Dies könnte zu signifikanten Unterschieden in Median oder 90. Perzentil führen, was sich bei der Durchführung einer Risikobewertung maßgeblich auswirken könnte, vor allem bei Umweltkonzentrationen, die im Bereich von biologischen Effektkonzentrationen liegen (vgl. z.B. Wenzel et al., 1999; Fenske et al., 2001). Aus diesem Grund, und wegen der Anwendung von einfacher MS zum Nachweis von EE2, wurden die Daten dieser Arbeit der Bewertungskategorie 2 zugeordnet (Tab. 8.4).

Cargouët et al., 2004 (EE2-11):

Primäres Ziel dieser Studie war die Evaluierung der Östrogenität von Flusswasser aus der Pariser Region mittels *in vitro*-Tests. Dabei wurden die beprobten Gewässer mit GC-MS auf ihren Gehalt an natürlichen Östrogenen und Ethinylöstradiol analysiert. Die Methodik und Vorgehensweise wurde in dieser und einer vorangehenden Publikation ausführlich beschrieben, jedoch kann auf Grund der einfachen MS als Detektionsmethode von EE2 eine Interferenz nicht ausgeschlossen werden, vor allem bei sehr heterogenen Matrices wie Kläranlagenzu- und Ablauf. Die Studie fand in der sehr dicht bevölkerten Region um Paris statt. Die Methodik der Probenahme wurde nur marginal erwähnt. Die Beprobungen fanden monatlich über ein halbes Jahr statt, wobei jeweils Einzelproben genommen und analysiert wurden. Die gemessenen Östrogenkonzentrationen wurden lediglich als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben, andere statistische Parameter werden nicht genannt. Keine der analysierten Proben lag unterhalb der Nachweisgrenze. Auf Grund des Nachweises von EE2 mit einfacher MS, wurden die Daten in die Bewertungskategorie 2 eingeteilt. Jedoch ist die Seine in der Region von Paris stark mit geklärtem Abwasser belastet, weshalb eine starke Kontamination mit Östrogenen nicht ausgeschlossen werden kann.

Williams et al., 2003 (EE2-12):

Eine sehr ausführliche Beschreibung der analytischen Verfahren unter Erfüllung aller nach dem TGD erforderlichen Qualitätskriterien. Außer Flusswasser wurden Kläranlagenausläufe und natürliche Flusssedimente beprobt und analysiert. Als Detektionsverfahren wurde GC-MS/MS angewendet. Die über 2 bzw. 4 Wochen andauernde und umfangreiche Probenahme ist ebenfalls ausführlich beschrieben mit Angabe und Beschreibung der Probenahmeorte und Lage zu benachbarten Kläranlagen. Leider wurden nur die gemessenen Maximalkonzentrationen und die Anzahl der Befunde oberhalb der Nachweisgrenze angegeben. Die Daten wurden auf Grund des hohen Qualitätsstandards der Arbeit der Bewertungskategorie 1 zugeordnet, jedoch müssen die Maximalkonzentrationen in einer Expositionsabschätzung als „worst-case“-Szenarium betrachtet werden.

Stachel et al., 2003 (EE2-13):

Im Rahmen dieser Studie von Stachel et al. (2003) wurde das Vorkommen von Xenoöstrogenen in der Wasserphase und in frisch sedimentiertem Material der Elbe und ihren Zuflüssen untersucht. Die Methodik der Aufbereitung der Proben und des Nachweises der untersuchten Substanzen wurde nur knapp beschrieben. Details zur Wiederfindung der Analyte bzw. der Standardzugaben werden nicht angegeben. Die Methodik der Beprobung von Oberflächengewässern und die Probenahmeorte werden ausführlich beschrieben, jedoch wird nicht angegeben, wie viele Proben jeweils entnommen wurden bzw. ob bei einfachen Stichproben Mehrfachanalysen durchgeführt wurden. Obwohl EE2 zwar nicht in Flusswasser und Sedimenten oberhalb der Nachweisgrenze bestimmt werden konnte, wurden die Daten auf Grund der unvollständigen Angaben zu den ausgewerteten Qualitätskriterien und der dadurch bedingten eingeschränkten Repräsentativität, sowie der Nachweismethode mit einfacher MS, konsequenterweise der Bewertungskategorie 2 zugeordnet.

Quellen zu Tonalid

Winkler et al., 1998 (AHTN-1):

Diese Studie von Winkler et al. (1998) enthält eine ausführliche Beschreibung der analytischen Methodik mit Angaben der geforderten Qualitätsparameter. Im Laufe eines Jahres wurden Proben von Oberflächenwasser an jeweils derselben Stelle der Elbe entnommen, wobei während der ersten 4 Monate wöchentlich, und anschließend alle 2 Wochen die Probenahmen stattfanden. Die Wiederfindungsrate wurde zu jedem Messzeitpunkt bestimmt und war konstant $> 70\%$. Außer Oberflächenwasser wurden zusätzlich im Wasser enthaltene Schwebstoffe analysiert, die mittels einer Durchflusszentrifuge vom Wasser getrennt wurden. Somit konnten Wassermischproben mit und ohne Schwebstoffgehalt analysiert werden. Verschiedene organo-chemische Parameter des Wassers wurden bestimmt, wie z.B. TOC und DOC. Diese *Monitoring*-Studie wurde ausgerichtet um verlässliche

und repräsentative Daten zur Belastung des Elbewassers mit synthetischen Moschusduftstoffen zu erhalten, weshalb diese Daten der Bewertungskategorie 1 zugeteilt wurden (Tab. 8.5).

Tab. 8.5: Auswertung von Referenzen mit Daten zu Oberflächenwasserkonzentrationen von AHTN nach in Kap. 3.2.1 beschriebenem Schema.

Kriterium	Referenzen zu AHTN (AHTN-1 bis AHTN-10)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Was wurde analysiert	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2. Analytische Methode	+	+	+	0	+	+	0	+	+ ¹	+ ¹
3. Einheiten	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4. Bestimmungsgrenze	+	+	+	-	+	+	+	+	+	0 ¹
5. Blindproben	-	0	+	-	0	-	-	+	+	0 ¹
6. Wiederfindungsrate	+	+	0	-	-	+	+	+	+ ¹	0 ¹
7. Reproduzierbarkeit	+	+	-	-	+	-	+	+	+ ¹	0 ¹
8. Probenahme	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+
9. Schema und Häufigkeit	+	+	-	-	+	-	-	0	+	+
10. Ort der Probenahme	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+
11. Datum der Proben	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
12. Charakterisierung der (des) Kompartimente(s)	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
13. Nähe zu Eintragsquellen	-	+	+	+	+	-	-	0	+	0
14. Statistik	+	+	-	-	-	+	-	0	0	0
15. Konzentrationen < BG	-	-	-	-	-	-	-	0	0	-
Anzahl +	12	13	9	4	11	6	7	10	13	7
Anzahl 0	0	1	1	1	1	1	1	4	2	6
Anzahl -	3	1	5	10	3	8	7	1	0	2
Bewertungskategorie ²	1	1	2	2	1	2	2	1	1	1

¹: Analytische Methode wurde in einer vorangegangenen Publikation detailliert beschrieben,

²: gemäß Beschreibung in Kap. 3.2.1.

Fromme et al., 2001 (AHTN-2):

Sehr sorgfältig und sehr ausführlich beschriebene Studie zum Vorkommen von polyzyklischen Moschusduftstoffen in verschiedenen aquatischen Kompartimenten in Berlin. Nahezu alle vom TGD verlangten Qualitätskriterien wurden dabei berücksichtigt und in einem hohen Qualitätsniveau erfüllt. Die analytische Qualität wurde mit der Messung von Blindproben und durch die Bestimmung einer Referenzsubstanz überprüft. Es wurden 30 zeitproportionale 24 h-Mischproben von Kläranlagenabläufen und 102 Proben von Oberflächenwasser aus einer standardisierten Wassertiefe entnommen und analysiert. Die Wasserproben stammten aus Gewässern mit unterschiedlich starker Abwasserbelastung, welche durch den prozentualen Anteil geklärten Abwassers spezifiziert wurde. Der Probenahmezeitraum erstreckte sich über ein Jahr während 1996-97. Diese Studie liefert eine sehr gute und verlässliche Übersicht über das Vorkommen polyzyklischer Moschusduftstoffe in verschiedenen Oberflächengewässern und wurde auf Grund der hohen analytischen Qualität und Repräsentativität der Proben in die Bewertungskategorie 1 eingeteilt (Tab. 8.5).

Bester et al., 1998 (AHTN-3):

Im Rahmen des deutschen *Monitoring*-Programms „BLMP“ wurden Proben von Seewasser aus der Nordsee und Wasser aus dem Mündungsbereich der Elbe auf die polyzyklischen Moschusduftstoffe AHTN und HHCB analysiert. Die 100 L-Proben wurden im Juni 1990 und Juni 1995 aus einer standardisierten Tiefe entnommen und anschließend extrahiert. Die angewendete analytische Methode ist ausführlich beschrieben, wobei auch Blindproben gemessen wurden, wobei eine Wiederfindungsrate von 66% erreicht wurde. Eine statistische Auswertung wurde nicht durchgeführt, da die wenigen Einzelmessungen separat aufgelistet wurden. Da der Mündungsbereich der Elbe nur einmal beprobt und analysiert wurde, und die Daten des analysierten Seewassers in einer gesonderten Expositionsabschätzung betrachtet werden müssen, kann dieses einzelne Datum zur AHTN-Konzentration in der Elbe als nicht repräsentativ für Oberflächengewässer betrachtet werden. Außerdem ist der Mündungsbereich eines Flusses durch den Gezeiteinfluss besonderen Bedingungen ausgesetzt, wodurch die Repräsentativität für Oberflächengewässer zusätzlich herabgesetzt ist. Deshalb wurde dieser einzelne Wert in die

Bewertungskategorie 2 eingeteilt, jedoch können die im Seewasser gemessenen Konzentrationen als adäquat für die Verwendung in einer Expositionsabschätzung für marine Gewässer betrachtet werden (Tab. 8.5).

Müller et al., 1996 (AHTN-4):

Das Ziel dieser Studie war der Nachweis von Nitro- und polyzyklischen Moschusduftstoffen in Humanfettgewebe. Dabei wurden einige Proben von Oberflächenwasser eher sekundär auf den Gehalt der untersuchten Substanzen hin analysiert, weshalb die analytische Methode und die Probenahmebedingungen nur am Rande erwähnt werden und nicht den Forderungen des TGD Kriterienkatalogs gerecht werden. Die Ergebnisse dieser Messungen werden für jede Substanz nur mit einem (*Maximal-?*) Wert angegeben. Aus diesen Gründen können diese Daten nicht für die Expositionsabschätzung von AHTN in Oberflächengewässern herangezogen werden. Dennoch gibt diese hervorragende Studie einen Einblick in das Vorkommen von Moschusduftstoffen in Humanfettgewebe, wobei erstaunliche Ergebnisse erhalten wurden (Tab. 8.5).

Heberer et al., 1999 (AHTN-5):

In dieser Studie von Heberer et al. (1999) wurden Kläranlagenabläufe und Oberflächengewässer während desselben Zeitraums und an den gleichen Orten untersucht, wie in der Arbeit von Fromme et al. (2001). Eine detaillierte Beschreibung der analytischen Methode ist vorhanden, allerdings werden keine Wiederfindungsraten angegeben. Die Reproduzierbarkeit wurde anhand von Dreifachmessungen demonstriert, wobei eine Standardabweichung von < 15% eingehalten wurde. Blindproben wurden routinemäßig analysiert, allerdings sind die Werte dieser Messungen nicht angegeben. Eine Übersichtskarte der Region zeigt exakt die 30 Probenahmeorte des Oberflächenwasser-Monitorings und deren Lage zu benachbarten Kläranlagen. Eine statistische Auswertung wurde nicht durchgeführt, aber sämtliche Ergebnisse sind als Einzelwerte angegeben. Die große Probenanzahl und die Auswahl charakteristischer Oberflächengewässer des Berliner Bezirks schafft einen verlässlichen und repräsentativen Überblick über das Vorkommen von synthetischen Moschusduftstoffen in dem untersuchten Gebiet. Die Daten wurden somit in die Bewertungskategorie 1 eingeteilt (Tab. 8.5).

Eschke et al., 1994 (AHTN-6):

Das Ziel dieser Arbeit war es, synthetische Moschusduftstoffe in verschiedenen Umweltkompartimenten nachzuweisen, und zwar in Kläranlagenzu- und -abläufen, in Oberflächengewässern und in Biotaprobe(n) (Fisch). Dabei wurden auch polyzyklische Moschusduftstoffe detektiert. Die angewendete analytische Methode ist ausreichend beschrieben, allerdings werden die Probenahmemethode und die Häufigkeit der Probenahme von Wasser- und Biotaprobe(n) nicht erwähnt. Es werden keine Angaben gemacht, ob es sich bei den Proben der Kläranlagenzu- und -abläufe um Stichproben oder um Mischproben handelt; die Gesamtzahl der Proben wird ebenfalls nicht genannt. Da wichtige Angaben zur Probenahme nicht gemacht werden und somit die Repräsentativität der Ergebnisse nicht gesichert ist, können die Daten nicht uneingeschränkt in der Expositionsabschätzung verwendet werden, und wurden deshalb in die Bewertungskategorie 2 eingeteilt (Tab. 8.5).

Lagois, 1996 (AHTN-7):

In der Arbeit von Lagois (1996) werden die Ergebnisse von Messungen des Gehalts polyzyklischer Moschusduftstoffe in Flusswasser, Uferfiltrat und Grundwasser dargestellt. Die dafür angewendete analytische Methode wird nur knapp erläutert. Die Probenahmemethode und die Anzahl der analysierten Proben werden nicht genannt. Die vom TGD geforderten Qualitätskriterien werden nicht hinreichend erfüllt, um die Daten für die uneingeschränkte Verwendung in der Expositionsabschätzung zuzulassen, deshalb wurden die Daten der Bewertungskategorie 2 zugeordnet. (Tab. 8.5).

Buerge et al., 2003 (AHTN-8):

Eine sehr detaillierte Beschreibung der analytischen Methode und Vorgehensweisen mit Angabe aller qualitätsrelevanten Parameter wie z.B. Bestimmungsgrenzen und Wiederfindungsraten. Das Ziel dieser Arbeit war das Maß der Photodegradation von Galaxolid und Tonalid in verschiedenen schweizer Oberflächengewässern zu bestimmen und die Eignung dieser Substanzen als anthropogene Marker für die Verschmutzung von Gewässern zu beurteilen. Mehrere Seen und Flüsse wurden stichprobenweise und einmalig beprobt. Die Probenahmeorte sind auf einer Landkarte in einer vorangegangenen Publikation genau beschrieben. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse wurde nicht durchgeführt, jedoch sind alle einzelnen Messwerte angegeben. Die Daten wurden in die Bewertungskategorie 1 eingeteilt und somit als adäquat für die Verwendung in einer Umweltrisikobewertung beurteilt.

Stackelberg et al., 2004 (AHTN-9):

Siehe Kommentare zu CBZ-6.

Osemwengie & Gerstenberger, 2004 (AHTN-10):

Osemwengie & Gerstenberger (2004) untersuchten die Belastung von mit Kläranlagenablauf belasteten Oberflächengewässern mit synthetischen Moschusduftstoffen und verglichen die gemessenen Konzentrationen mit dem Gehalt an diesen Stoffen im Gewebe von Fischen (*Cyprinus carpio*) eines Sees in den USA. Dabei wurden Kläranlagenabläufe und Seewasser über einen Zeitraum eines Jahres bzw. sieben Monaten zweimal monatlich beprobt und analysiert. Die chemisch-analytischen Methoden wurden in einer vorangehenden Publikation detailliert erläutert und validiert. Die gemessenen Konzentrationen wurden als Durchschnittswerte pro Monat (n=2) sowie daraus berechneten Durchschnittswerten pro Jahr angegeben, wobei jedoch die Werte unterhalb der Nachweisgrenze nicht berücksichtigt wurden. Die im TGD genannten Qualitätskriterien wurden größtenteils erfüllt, weshalb die Daten der Bewertungskategorie 1 zugeordnet wurden. Allerdings sollten die Daten lediglich für die Expositionsabschätzung in Seewasser verwendet werden, da der untersuchte See (Lake Mead) einer der größten Süßwasserreservoirs der nördlichen Hemisphäre darstellt und somit eine begrenzte Repräsentativität für Oberflächengewässer gewährleistet ist.

8.3 Ergebnisse der Literaturrecherche zu Effektdaten der ausgewählten PPCPs

Eine ausführliche und übersichtliche Auflistung aller mittels einer Literaturrecherche (s. Kap. 2.1.2) zusammengetragenen und durch eigene Studien ermittelten Effektdaten zu den ausgewählten Substanzen befindet sich in Tab. 8.6 bis Tab. 8.9. Diese Datenlisten dienen als Grundlage zur Herleitung der in der Risikocharakterisierung verwendeten PNECs, der zu erwartenden ‚Nicht-Effekt-Konzentrationen‘, für die jeweiligen Substanzen (Kap. 4). Dabei wurden jeweils für Kurzzeit- und Langzeitstudien der sensitivste Testorganismus und die entsprechenden Effektdaten substanzspezifisch ausgewählt.

8.3.1 Effektdaten zu CBZ

In klassischen akuten Toxizitätsstudien mit den Standardorganismen Alge, Daphnie und Fisch, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden (Kap. 2.2.1), erwies sich der Zebraquarienfisch als der sensitivste Organismus gegenüber CBZ mit einer $LC_{50} = 35 \text{ mg/L}$ (Tab. 8.6). Andere Testorganismen wie der Afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* oder die Zwergdeckelschnecke *Potamopyrgus antipodarum* ließen bei Kurzzeitstudien keine höhere Toxizität erkennen (Pflüger et al., 2000; Oetken et al., eingereicht). Kurzzeitstudien und Sediment-Toxizitätsstudien mit dem Oligochaeten *L. variegatus* resultierten in Effektkonzentrationen von $> 4 \text{ mg/L}$, bzw. $> 10 \text{ mg/kg TG Sediment}$ (Oetken et al., eingereicht). Bei Toxizitätsstudien mit verschiedenen Invertebraten (Ferrari et al., 2003) zeigte sich allerdings bei *D. magna* eine höhere Sensitivität gegenüber CBZ, als zuvor in vergleichbaren Studien festgestellt (Pflüger et al., 2000; Cleuvers, 2002). Dabei wurde eine $EC_{50} = 13,8 \text{ mg/L}$ bezüglich der Immobilisierung ermittelt (Tab. 8.6). Dies verdeutlicht die mögliche Varianz der Sensitivität innerhalb ein und derselben Art, sogenannte Intra-Speziesvariationen. Niedrigere Effektkonzentrationen zeigten sich bei Langzeitstudien mit Crustaceen und Insekten. Eine Reproduktionsstudie mit *D. magna* resultierte in einer $NOEC = 0,4 \text{ mg/L}$ (Kap. 2.2.2), eine vergleichbare Studie mit *C. dubia* resultierte in einer $NOEC = 0,025 \text{ mg/L}$ (Ferrari et al., 2003), welche die niedrigste verfügbare Langzeit-Effektkonzentration für CBZ darstellt. In einem Sediment-Toxizitätstest mit *Chironomus riparius* wurde die LOEC bezüglich der Schlupfrate bei der niedrigsten Testkonzentration von $0,14 \text{ mg/kg TG Sediment}$ festgestellt (Oetken et al., eingereicht). Der Verdacht auf endokrine Wirksamkeit von CBZ konnte in mehreren *in vitro*-Studien mit Gewebe der Regenbogenforelle (z.B. CERBA – competitive estrogen receptor binding assay) nicht bestätigt werden (Pflüger et al., 2001).

Tab. 8.6: In wissenschaftlicher Literatur verfügbare und aus eigenen Untersuchungen hergeleitete Effektdaten zu Carbamazepin (CBZ).

Testorganismus	Testsystem	Richtlinie	Endpunkt(e)	Testdauer und -bedingungen	Effektkonzentration	Referenz
<i>Vibrio fischeri</i> (Bacteria)	Akuter Inhibitionstest	AFNOR T90-320-3, 1999	Inhibition von Lichtemission	30 min, statisch	EC ₅₀ > 81 mg/L	Ferrari et al. (2003)
<i>Ankistrodesmus braunii</i> , <i>Selenastrum capricornutum</i> (Grünalgen)	Akute Toxizitätstests	-	Zellvermehrung	96 h, statisch; 2,1 µg/L bis 20 mg/L	Keine Effekte	Andreozzi et al. (2002)
<i>Scenedesmus subspicatus</i> (Grünalge)	Algenwachstum-inhibitionstest	67/548/EWG 1992 Anhang V Teil C.3	Zellvermehrung	96 h, statisch	EC ₅₀ = 85 mg/L EC ₁₀ = 27 mg/L	Cleuvers (2002)
<i>Brachionus calyciflorus</i> (Rädertier)	Rotokit - Toxizitätstest	AFNOR T90-377, 2000	Reproduktion	48 h, statisch	NOEC = 0,377 mg/L	Ferrari et al. (2003)
<i>Lumbriculus variegatus</i> (Wenigborster)	Akuter Toxizitätstest	-	Mortalität	96 h, statisch; 0,5, 10, 200, 4000 µg/L	LC ₅₀ > 4 mg/L	Nentwig et al. (2004)
<i>Chironomus riparius</i> (Zuckmücke)	Akuter Toxizitätstest	-	Mortalität	24 h, statisch; 0,5, 1, 20, 400 µg/L	LC ₅₀ > 0,4 mg/L	
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (Wasserfloh)	Akuter Toxizitätstest	EPA, 1991	Immobilisierung	48 h, statisch	EC ₅₀ = 77,7 mg/L	Ferrari et al. (2003)
<i>Daphnia magna</i> (Wasserfloh)	Akuter Toxizitätstest	67/548/EWG 1992 Anhang V Teil C.2	Immobilisierung	48 h, statisch	EC ₅₀ = 157 mg/L EC ₁₀ = 12 mg/L	Cleuvers (2002)
<i>Daphnia magna</i> (Wasserfloh)	Akuter Toxizitätstest	OECD 202, 1984	Immobilisierung	48 h, statisch; 40-120 mg/L	EC ₅₀ = 67,5 mg/L	Pfluger et al. (2000)
<i>Daphnia magna</i> (Wasserfloh)	Akuter Toxizitätstest	AFNOR T90-301, 1996	Immobilisierung	48 h, statisch	EC ₅₀ = 13,8 mg/L	Ferrari et al. (2003)
<i>Xenopus laevis</i> (Afrikanischer Krallenfrosch)	FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay-Xenopus)	ASTM E 1439-91, 1997	Mortalität, Teratogenese	96 h, semi-statisch; 50-180 mg/L	EC ₅₀ (Terat.) = 94 mg/L LC ₅₀ = 119 mg/L	Pfluger et al. (2000)
<i>Danio rerio</i> (Zebraabärbling)	DRETA (Danio rerio Embryo Teratogenesis Assay)	-	Mortalität und Teratogenese bei Fischembryonen	96 h, semi-statisch; 20-200 mg/L	EC ₅₀ (Terat.) = 83 mg/L LC ₅₀ = 124 mg/L	Pfluger et al. (2000)
<i>Danio rerio</i> (Zebraabärbling)	Fischembryo Toxizitätstest	OECD-Richtlinienentwurf, 1998	Mortalität und Teratogenese bei Fischembryonen	48 h, statisch; 6,25-100 mg/L	LC/EC ₅₀ > 100 mg/L	diese Arbeit

Fortsetzung Tab. 8.6

Testorganismus	Testsystem	Richtlinie	Endpunkt(e)	Testdauer und -bedingungen	Effektkonzentration	Referenz
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	Akuter Toxizitätstest	67/548/EEC 1992 Anhang V Teil C.1	Mortalität	96 h, statisch; 6,25-100 mg/L	LC ₅₀ = 35,4 mg/L	diese Arbeit
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Regenbogenforelle)	Test auf endokrine Disruption (<i>in vitro</i>)	-	östrogene Aktivität, CERBA (<i>Competitive Estrogen Receptor Binding Assay</i>)	10 ⁻⁸ -10 ⁻³ M (23,6 µg/L - 2,36 g/L)	Kein Effekt	Pfluger et al. (2001)
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Grünalge)	Algenwachstum-inhibitionstest	-	Zellvermehrung	96 h, statisch	NOEC > 100 mg/L	Ferrari et al. (2003)
<i>Ankistrodesmus braunii</i> (Grünalge)	<i>In vitro</i> Langzeitstudie; Bioakkumulation	-	Bioakkumulation	60 d; 19 mg/L	nach 60 d noch 50% des CBZ im Medium nachweisbar (keine Mineralisation); keine Akkumulation in Biota	Andreozzi et al. (2002)
<i>Lumbriculus variegatus</i> (Wenigborster)	Sediment-Toxizitätstest	OECD-Richtlinienentwurf 218, 2001	Reproduktion, Biomasse	28 d, statisch; 0,625-10 mg/kg Sediment TG	NOEC _{Reproduktion} > 10 mg/kg NOEC _{Biomasse} > 10 mg/kg	Oetken et al. ¹
<i>Chironomus riparius</i> (Zuckmücke)	Sediment-Toxizitätstest	OECD-Richtlinienentwurf 218, 2001	Schlupfrate	28 d, statisch; 0,625-10 mg/kg Sediment TG	NOEC _{Schlupfrate} < 0,14 mg/kg LOEC _{Schlupfrate} = 0,14 mg/kg EC _{50 Schlupfrate} = 0,19 mg/kg (bez. auf gemessene Testkonzentrationen)	
<i>Potamopyrgus antipodarum</i> (Schnecke)	Reproduktionstest	-	Reproduktion	28 d, semi-statisch; 0,4-250 mg/L	Kein Effekt	Nentwig et al. (2004)
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (Wasserfloh)	Reproduktionstest	AFNOR T90-376, 2000	Reproduktion	7 d, semi-statisch	NOEC _{Reproduktion} = 0,025 mg/L LOEC _{Reproduktion} = 0,1 mg/L	Ferrari et al. (2003)
<i>Daphnia magna</i> (Wasserfloh)	Reproduktionstest	67/548/EWG 1992 Anhang V Teil C.20	Reproduktion, Mortalität, Wachstum	21 d, semi-statisch; 0,4-40 mg/L	NOEC _{Mortalität} = 4 mg/L NOEC _{Reproduktion} = 0,4 mg/L NOEC _{Wachstum} = 0,4 mg/L LOEC _{Mortalität} = 12,6 mg/L LOEC _{Reproduktion} = 1,26 mg/L LOEC _{Wachstum} = 1,26 mg/L EC _{50 Reproduktion} = 6,6 mg/L EC _{50 Mortalität} = 9,4 mg/L	diese Arbeit
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	Embryo/Larven Toxizitätstest	ISO 12890, 1999	Mortalität, Schlupfrate	10 d, Durchfluss	NOEC = 25 mg/L	Ferrari et al. (2003)

¹: eingereicht

Tab. 8.7: In wissenschaftlicher Literatur verfügbare und aus eigenen Untersuchungen hergeleitete Effektdaten zu Sulfamethoxazol (SMX).

Testorganismus	Testsystem	Richtlinie	Endpunkt(e)	Testdauer und -bedingungen	Effektkonzentration	Referenz
<i>Pseudomonas putida</i> (Bacteria)	Wachstum-inhibitionstest	ISO 17 012, 1995	Wachstum	< 0,002 bis > 256 mg/L	IC ₅₀ = 256 mg/L	Al-Ahmad et al. (1999)
<i>Scenedesmus subspicatus</i> (Grünalge)	Algenwachstum-inhibitionstest	67/548/EWG 1992 Anhang V Teil C.3	Zellvermehrung (<i>b</i>), Wachstumsrate (<i>r</i>)	96 h, statisch; 2,5-100 mg/L	E _b C _{50/72 h} = 3,16 mg/L E _b C _{50/96 h} = 3,21 mg/L E _r C _{50/72 h} = 6,6 mg/L E _r C _{50/96 h} = 4,96 mg/L NOEC < 2,5 mg/L LOEC = 2,5 mg/L	diese Arbeit
<i>Daphnia magna</i> (Wasserfloh)	Akuter Toxizitätstest	67/548/EWG 1992 Anhang V Teil C.2	Immobilisierung	48 h, statisch; 5-160 mg/L	EC ₅₀ = 125 mg/L (NOEC = 80 mg/L)	
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	Akuter Toxizitätstest	67/548/EWG 1992 Anhang V Teil C.1	Mortalität	96 h, statisch; 100 mg/L (Limit-Test)	LC ₅₀ > 100 mg/L	
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	Fischembryo Toxizitätstest	OECD-Richtlinienentwurf, 1998	Mortalität, Teratogenese, Herzschlagfrequenz	48 h, statisch; 100 mg/L (Limit-Test)	LC/EC ₅₀ > 100 mg/L	
<i>Lemna gibba</i> (Wasserlinse)	Phototoxizitätstest	ASTM E1415-91, 1998	Wachstum, Frondzahl, biochemische Parameter (Pigmente)	7 d, semi-statisch; 10, 30, 100, 300, 1.000 µg/L	LOEC _{Biomasse} = 100 µg/L LOEC _{Frondzahl} = 30 µg/L NOEC _{Biomasse} = 30 µg/L NOEC _{Frondzahl} = 10 µg/L EC _{50 Biomasse} = 81 µg/L EC _{50 Frondzahl} = 249 µg/L EC _{50 Chlorophyll a} = 985 µg/L EC _{50 Chlorophyll b} = 682 µg/L EC _{50 Carotinoide} = 4963 µg/L	Brain et al. (2004)

Tab. 8.8: In wissenschaftlicher Literatur verfügbare und aus eigenen Untersuchungen hergeleitete Effektdaten zu 17 α -Ethinylöstradiol (EE2).

Testorganismus	Testsystem	Richtlinie	Endpunkt(e)	Testdauer und -bedingungen	Effektkonzentration	Referenz
<i>Azotobacter beijerincki</i> (Bacteria)	Akuter Inhibitionstest	FDA, TAD 4.02	Wachstumshemmung	72 h; 0,02-20 mg/L	Kein Effekt	Schweinfurth et al. (1997)
<i>Pseudomonas putida</i> (Bacteria)	Akuter Inhibitionstest	FDA, TAD 4.02	Wachstumshemmung	16 h; 0,02-20 mg/L	Kein Effekt	
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (<i>Vibrio fischeri</i>)	Akuter Inhibitionstest	DIN 38412, Teil 34, 1991	Inhibition von Lichtemission	30 min, statisch	EC ₅₀ = 212 mg/L EC ₁₀ = 12,6 mg/L	Kopf (1997)
<i>Aspergillus niger</i> (Schimmelpilz)	Akuter Inhibitionstest	FDA, TAD 4.02	Wachstumshemmung	96 h; 0,02-20 mg/L	Kein Effekt	Schweinfurth et al. (1997)
<i>Chaetomium globosum</i> (Schimmelpilz)	Akuter Inhibitionstest	FDA, TAD 4.02	Wachstumshemmung	96 h; 0,02-20 mg/L	Kein Effekt	
<i>Nostoc ellipsosporum</i> (Blualge)	Akuter Inhibitionstest	FDA, TAD 4.02	Wachstumshemmung	14 d; 0,02-20 mg/L	Kein Effekt	
<i>Scenedesmus subspicatus</i> (Grünalge)	Algenwachstum-inhibitionstest	DIN-EN 28692, DIN 38412, Teil 9	Zellvermehrung	72 h; 0,01-1,0 mg/L	EC ₅₀ = 0,84 mg/L EC ₁₀ = 0,054 mg/L	Kopf (1997)
<i>Hydra vulgaris</i> (Süßwasserpolyp)	Akuter Toxizitätstest	-	Mortalität	96 h, semi-statisch; 1,6-10 mg/L	LC ₅₀ = 3,8 mg/L	Pascoe et al. (2002)
<i>Hydra vulgaris</i> (Süßwasserpolyp)	Akuter Toxizitätstest	-	Morphol. und physiol. Veränderungen	72 h, semi-statisch; 10 ng/L bis 5 mg/L	Kontraktierte Körper und beschädigte Tentakel bei $\geq 58 \mu\text{g/L}$	
<i>Daphnia magna</i> (Wasserfloh)	Akuter Toxizitätstest	DIN 38412 L 11	Immobilisierung	24 h, statisch	EC ₅₀ = 5,7 mg/L EC ₁₀ = 3,2 mg/L	Kopf (1997)
<i>Daphnia magna</i> (Wasserfloh)	Akuter Toxizitätstest	FDA, TAD 4.08	Immobilisierung	48 h, statisch; 0,7-7,3 mg/L	EC ₅₀ = 6,4 mg/L	Schweinfurth et al. (1997)
<i>Gammarus pulex</i> (Bachflohkrebs)	Akuter Toxizitätstest	-	a) Mortalität, b) Paarungsverhalten	a) 10 d, semi-statisch; 0,3-10 mg/L b) 24 h, statisch; 10 ng/L - 3,7 mg/L	a) LC _{50/48h} = 4,19 mg/L LC _{50/10d} = 0,84 mg/L b) kein Effekt	Watts et al. (2001a)
<i>Danio rerio</i> (Zebrafisch)	Akuter Toxizitätstest	-	Mortalität	96 h	LC ₅₀ = 1,72 mg/L	Wenzel et al. (2001)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Regenbogenforelle)	Akuter Toxizitätstest	FDA, TAD 4.11	Mortalität	96 h, statisch; 0,2-3,2 mg/L	LC ₅₀ = 1,6 mg/L	Schweinfurth et al. (1997)

Fortsetzung Tab. 8.8

Testorganismus	Testsystem	Richtlinie	Endpunkt(e)	Testdauer und -bedingungen	Effektkonzentration	Referenz
<i>Scophthalmus maximus</i> (Steinbutt)	Akute Toxizität (Larven 2 Tage nach Schlupf)	-	Mortalität, Körperlänge, Dottersackvolumen, Morphologie	72 h, semi-statisch; 100-1000 µg/L	LOEC _{Mortalität} = 250 µg/L	Jordan & Waring (2000) ¹
<i>Hydra vulgaris</i> (Süßwasserpolyp)	Chronischer Toxizitätstest	-	Geschlechtsentwicklung und Knospung	6 Wochen, semi-statisch; 10, 100, 500 µg/L	Beeinträchtigung verschiedener Geschlechtsparameter bei 500 µg/L	Pascoe et al. (2002)
<i>Potamopyrgus antipodarum</i> (Zwergdeckelschnecke)	Chronischer Toxizitätstest	-	Reproduktion (Anzahl Embryonen)	9 Wochen, Durchfluss; 1, 5, 25 u. 100 ng/L	Nach 3 Wochen erhöhte Anzahl Embryonen bei ≥ 1 ng/L (außer bei 100 ng/L); nach 9 Wochen erhöhte Anzahl Embryonen bei ≥ 25 ng/L	Jobling et al. (2004)
<i>Lumbriculus variegatus</i> (Wenigborster)	Sediment-Toxizität	-	Reproduktion, Biomasse	28 d, statisch; 1-100 mg/kg Sediment TG	NOEC = 31,6 mg/kg EC ₅₀ Reproduktion = 90 mg/kg EC ₅₀ Biomasse = 110 mg/kg	diese Arbeit
<i>Lumbriculus variegatus</i> (Wenigborster)	Sediment-Bioakkumulationsstudie	-	Bioakkumulation, Elimination	35 d Akkumulation, statisch; 300 ng/kg TG	AF _{lipid/OC} 35 d = 75 AF _{FG/FG} 35 d = 90 (Gesamtradioaktivität)	
<i>Chironomus riparius</i> (Zuckmücke)	Sediment-Toxizität	-	Mortalität, Deformationen d. Mundwerkzeuge	9 d, semi-statisch; 1, 10, 100 µg/L	NOEC ≥ 100 µg/L	Meregalli et al. (2001)
<i>Chironomus riparius</i> (Zuckmücke)	Sediment-Toxizität	-	Entwicklung, Eiproduktion, Zeitpunkt des Schlüpfens (EmT ₅₀)	2 Generationen, statisch; 1-100 ng/L	Signifikant früherer Zeitpunkt des Schlüpfens in erster und zweiter Generation bei 1 ng/L	Watts et al. (2001b)
<i>Chironomus riparius</i> (Zuckmücke)	Chronischer Toxizitätstest	-	Häutungsprozess, Biomasse, Deformationen d. Mundwerkzeuge	Bis Ende 4. Larvalstadium, semi-statisch; 10 ng/L bis 1 mg/L	LOEC _{Häutung, Biomasse} = 1 mg/L; signif. Verformungen von Mundwerkzeugen bei 10 ng/L bis 10 µg/L	Watts et al. (2003)
<i>Lymnaea stagnalis</i> (Spitzschlamm Schnecke)	„life-cycle“-Studie	-	Mortalität, Schlupf, Wachstum, Histopathologie	3 und 10 Wochen	Veränderungen im Proteinstoffwechsel und verringertes Wachstum von Juvenilen bei 50-500 ng/L	Segner et al. (2003a)
<i>Daphnia magna</i> (Wasserfloh)	Reproduktionstest	OECD 202/II Richtlinienentwurf, 1995	Reproduktion	21 d	EC ₅₀ = 105 µg/L NOEC = 10 µg/L	Kopf (1997)
<i>Daphnia magna</i> (Wasserfloh)	Reproduktionstest	FDA, TAD 4.09	Reproduktion	21 d; 19-387 µg/L	Kein Effekt	Schweinfurth et al. (1997)

Fortsetzung Tab. 8.8

Testorganismus	Testsystem	Richtlinie	Endpunkt(e)	Testdauer und -bedingungen	Effektkonzentration	Referenz
<i>Hyaella azteca</i> (Bachflohkrebs)	Multigenerationsstudie	-	Geschlechtsentwicklung	35 Wochen, semi-statisch; 0,1-10 µg/L	F ₁ -Generation, Männchen: kleinere 2. Gnathopoden bei 0,1 und 0,32 µg/L; F ₂ -Gen., Männchen: gestörte Entwicklung d. Gonaden bei 0,1 und 0,32 µg/L	Vandenbergh et al. (2003)
<i>Gammarus pulex</i> (Bachflohkrebs)	Chronischer Toxizitätstest	-	Effekte auf Populationsebene, sekundäre Geschlechtsmerkmale	100 d, Durchfluss; 100 ng/L, 1 µg/L, 10 µg/L	Signifikante Zunahme der Populationsgröße bei 1 und 10 µg/L; signifikante Verschiebung des Geschlechterverhältnisses in allen 3 Konzentrationen (weib./männch. 2:1; Kontrolle 1:1)	Watts et al. (2002)
<i>Cyprinodon variegatus</i> (Edelsteinkärpfling)	Partielle „life-cycle“-Studie	-	Reproduktion, Überlebensrate der Nachkommen, histologische Parameter	59 d, Durchfluss; 0,2, 2, 20, 200, 400, 800, 1600, 3200 ng/L	NOEC _{Reproduktion} = 20 ng/L NOEC _{Überlebensrate} = 200 ng/L NOEC _{Testis-Ova} = 2 ng/L NOEC _{Hoden-Fibrose} = 0,2 ng/L Gewebsveränderungen in Ovarien ≥ 2 ng/L	Zillioux et al. (2001)
<i>Cyprinodon variegatus</i> (Edelsteinkärpfling)	Vitellogenin-Bioassay	ASTM 1988 <i>guidelines for conducting flow-through aquatic toxicant exposures with fish</i>	Induktion von Plasma-VTG, Induktion von Leber-VTG-mRNA	16 d, Durchfluss; 20, 100, 200, 500, 1000 ng/L	LOEC _{Plasma-VTG} = 100 ng/L; Induktion von VTG-mRNA bei 100 ng/L nach 2 d	Folmar et al. (2000)
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	Langzeit Toxizitätstest	-	Mortalität	28 d	LC ₅₀ = 100 ng/L NOEC = 10 ng/L ²	Wenzel et al. (2001)
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	Langzeit Toxizitätstest	-	Mortalität	30 d, Durchfluss; 10-200 ng/L	NOEC = 20 ng/L LOEC = 50 ng/L (keine statistische Auswertung!)	Petersen et al. (2000)
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	Kurzzeittest für endokrine Disruption	-	Vitellogenin-induktion (in Männchen)	10 d, Durchfluss; 0,1-3,2 ng/L	NOEC = 1 ng/L LOEC = 3,2 ng/L	Duis & Knaacker, (2003)
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	Kurzzeittest für endokrine Disruption	-	Plasma-Vitellogenin (in Männchen)	21 d, semi-statisch; 1,67, 3,0, 7,5, 10, 20 ng/L	LOEC _{VTG-Induktion} = 1,67 ng/L	Fenske et al. (2001)
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	„life-cycle“-Studie (Multigenerationsstudie)	-	Befruchtungsrate	43 Wochen; 0,005-10 ng/L	EC ₅₀ Befruchtung = 1,2 ng/L LOEC _{Befruchtung} = 1,1 ng/L NOEC _{Befruchtung} = 0,3 ng/L	Wenzel et al. (1999)

Fortsetzung Tab. 8.8

Testorganismus	Testsystem	Richtlinie	Endpunkt(e)	Testdauer und -bedingungen	Effektkonzentration	Referenz
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	„life-cycle“-Studie (Multigenerationsstudie)	-	Mortalität, Wachstum, Verhalten, Eiproduktion, Befruchtungsrate	Durchfluss; 0,05, 0,28, 1,7 und 10 ng/L	EC ₅₀ Befruchtung = 0,0037 nM (\triangleq 1,1 ng/L)	Segner et al. (2003b)
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	„life-cycle“-Studie (Multigenerationsstudie)	-	Mortalität, Wachstum, Eiproduktion, Reproduktionserfolg, Überlebensrate befruchteter Eier, Plasmavitellogenin	Durchfluss; 0,5 und 5 ng/L	F ₀ : keine Effekte (Wachstum 52d, Mortalität der Embryonen); F ₁ : nach 210 d verringerte Eiproduktion, keine überlebensfähigen Eier bei 5 ng/L, Abnormalitäten der Testes bei allen Männchen	Nash et al. (2004)
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	Langzeittest für endokrine Disruption	-	VTG in Ganzkörperhomogenat	Versch. Lebensstadien bis 60 d, semi-statisch; 15,4 ng/L	Erhöhte VTG-Induktion in allen Lebensstadien; Intersex und Feminisierung nach 20-60 d Exposition	Andersen et al. (2003)
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	Kurzzeittest für endokrine Disruption	-	Expression östrogen-induzierter Gene, histol. Parameter	4 u. 21 d, Durchfluss; 0,25-85 ng/L	LOEC für VTG und Östrogenrezeptor α bei 2,5 ng/L nach 4 d	Islinger et al. (2003)
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	Fischembryo Toxizitätstest	-	Mortalität, Schlupfrate	Embryonen (11 h), 120 h, semi-statisch; 1, 10 u. 100 ng/L	Verringerte Schlupfrate bei 100 ng/L	Versonnen & Janssen (2004)
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	Kurzzeittest für endokrine Disruption	-	Wachstum, VTG in Ganzkörperhomogenat, histol. Parameter	Juvenile (1 Monat), 33 d, semi-statisch; 1, 10 u. 100 ng/L	Abnahme von Körperlänge und Gewicht bei 100 ng/L; keine signifikante VTG-Induktion	
<i>Danio rerio</i> (Zebrabärbling)	Kurzzeittest für endokrine Disruption	-	Wachstum, Plasma-VTG, histol. Parameter	Adulte (8 Monate), 14 d, semi-statisch; 1, 10 u. 100 ng/L	signifikante VTG-Induktion bei \geq 10 ng/L (in Männchen u. Weibchen); Reduktion des GSI in Weibchen bei \geq 10 ng/L	
<i>Leuciscus idus</i> (Goldorfe)	Kurzzeittest für endokrine Disruption	-	Plasma-VTG	7 und 10 d, Durchfluss; 6 und 50 ng/L	signifikante VTG-Induktion bei 6 ng/L	Allner et al. (1999)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Regenbogenforelle)	Kurzzeittest für endokrine Disruption	-	Plasma-VTG	7 d, Durchfluss; 4 ng/L	signifikante VTG-Induktion bei 4 ng/L	

Fortsetzung Tab. 8.8

Testorganismus	Testsystem	Richtlinie	Endpunkt(e)	Testdauer und -bedingungen	Effektkonzentration	Referenz
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Regenbogenforelle)	Kurzzeittest für endokrine Disruption	-	Plasma-VTG (in Männchen)	10 d, Durchfluss; 0,1, 0,5, 1,0, 10 ng/L	LOEC _{Plasma-VTG} = 0,1 ng/L	Purdom et al. (1994)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Regenbogenforelle)	Kurzzeittest für endokrine Disruption (als Positivkontrolle zu APs)	-	Plasma-VTG	21 d, Durchfluss; 2 ng/L	signifikante Effekte: erhöhte Plasma-VTG-Konzentrationen, verringerter GSI, verringerte Spermatogenese	Jobling et al. (1996)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Regenbogenforelle)	Langzeittest für endokrine Disruption	-	Vitellogenin	28 Wochen, Durchfluss; 0,1, 0,3, 1,0 ng/L	NOEC _{Plasma-VTG} = 0,1 ng/L LOEC _{Plasma-VTG} = 0,3 ng/L	Sheahan et al. (1994)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Regenbogenforelle)	Langzeittest für endokrine Disruption	-	Plasma-VTG (Induktion und Elimination)	48 d, intra-arteriell; 0,001, 0,1, 1,0, 10 mg/kg	max. VTG-Konzentrat. nach 7-9 d: jeweils 0,05, 711, 1521 und 2547 µg/mL für die 0,001, 0,1, 1,0, und 10 mg/kg Dosierungen	Schultz et al. (2001)
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Regenbogenforelle)	Langzeittest für endokrine Disruption	-	Befruchtungsrate, Qualität von Spermien,	62 d, Durchfluss; 10, 100, 1000 ng/L	Erhöhung der Spermiedichte bei 10 und 100 ng/L; 50% Reduzierung von sich normal entwickelnden Larven bei 10 und 100 ng/L	Schultz et al. (2003)
<i>Oryzias latipes</i> (Medaka)	Kurzzeittest für endokrine Disruption	-	Befruchtungsrate, VTG-Induktion in der Leber, Intersex (Testis-Ova)	21 d, Durchfluss; 32,6-488 ng/L	Signif. Anstieg der Leber-VTG-Konzentration bei 64 ng/L; Auftreten von Testis-Ova bei ≥64 ng/L	Seki et al. (2002)
<i>Oryzias latipes</i> (Medaka)	Chronischer Toxizitätstest	-	Reproduktion, Aromatase-Genexpression, histol. Veränderungen	2 Monate, semi-statisch; 1, 10, 100 ng/L	Verringerte Eiproduktion und Aromatase in Testis nachweisbar bei 10 ng/L	Scholz & Gutzeit (2000)
<i>Oryzias latipes</i> (Medaka)	Langzeittest für endokrine Disruption	-	Geschlechtsdifferenzierung und -entwicklung	3 Monate, Durchfluss; 0,005, 0,05, 0,5, 2,5, 5 ng/Ei (Nanoinjektion)	LOEC _{Geschlechtsumwandlung} = 0,5 ng/Ei 91% Mortalität bei 5,0 ng/Ei	Papoulias et al. (2000)
<i>Oryzias latipes</i> (Medaka)	Langzeittest für endokrine Disruption	-	Reproduktionsverhalten, Reproduktionserfolg, Befruchtungssrate, histologische Parameter	4-6 Monate, semi-statisch; 0,2, 2 und 10 ng/L	Abnahme der Kopulationsversuche (Männchen u. Weibchen) sowie des Reproduktionserfolgs bei 10 ng/L; Vorkommen von Intersex (<i>testis-ova</i>) bei 2 ng/L	Balch et al. (2004)

Fortsetzung Tab. 8.8

Testorganismus	Testsystem	Richtlinie	Endpunkt(e)	Testdauer und -bedingungen	Effektkonzentration	Referenz
<i>Oryzias latipes</i> (Medaka)	Langzeittest für endokrine Disruption	-	Histologische Parameter (Hepato-, Nephro- und Gonadotoxizität)	4-6 Monate, semi-statisch; 10 ng/L	Signifikante Zunahme von Leber- und Nierennekrose sowie Nekrosen der Testis bei Männchen im Vergleich zur Kontrolle	Weber et al. (2004)
<i>Pimephales promelas</i> (Dickkopfelritze)	Chronischer Toxizitätstest	-	Mortalität, Wachstum, Morphologie, Histopathologie, Oviposition	28 d; 0,01-10 µg/L	erhöhte Mortalität bei 1,0 µg/L; histopathologische Veränderungen in der Leber und den Nieren ≥0,01µg/L; keine Eiablage bei ≥0,01 µg/L	Schweinfurth et al. (1997)
<i>Pimephales promelas</i> (Dickkopfelritze)	Langzeittest für endokrine Disruption	-	Wachstum, Plasma-VTG, Eiproduktion	21 d, Durchfluss; 0,1, 1, 3, 10 u. 100 ng/L; anschließend 21 d unkontaminiert	VTG-Induktion bei ≥ 1 ng/L in Männchen und Weibchen; erhöhte Eiproduktion bei 0,1-3 ng/L; reduzierte Eiprod. bei 10 ng/L; keine Eiprod. bei 100 ng/L	Jobling et al. (2004)
<i>Pimephales promelas</i> (Dickkopfelritze)	Langzeittest für endokrine Disruption	-	Wachstum, Plasma-VTG, Eiproduktion	21 d, Durchfluss; 0,1, 1, 3, 10 u. 100 ng/L; anschließend 21 d unkontaminiert	VTG-Induktion bei ≥ 1 ng/L in Männchen und Weibchen; erhöhte Eiproduktion bei 0,1-3 ng/L; reduzierte Eiprod. bei 10 ng/L; keine Eiprod. bei 100 ng/L	Pawlowski et al. (2004)
<i>Pimephales promelas</i> (Dickkopfelritze)	„life-cycle“-Studie (Multigenerationsstudie)	EPA 540/-9-86-137	Mortalität, Reproduktion, morphol. u. histol. Parameter, Biokonzentration	44 Wochen; 0,2, 1, 4, 16, 64 ng/L	NOEC _{Gesamt} = 1,0 ng/L LOEC _{Gesamt} = 4,0 ng/L BCF _(158 d nach Schlupf bei 64 ng/L) = 660 BCF _(245 d nach Schlupf bei 16 ng/L) = 610	Länge et al. (2001)
<i>Salvelinus namaycush</i> (Amerikanischer Seesaibling)	Kurzzeittest für endokrine Disruption	-	VTG-Induktion, Metallothioneinkonzentration (MT), histologische Parameter	21 d, Durchfluss; 4, 40, 400 ng/L	VTG-Induktion bei ≥ 4 ng/L u. Zunahme d. LSI (Leber-somatischer Index) bei ≥ 40 ng/L in Männchen u. Weibchen; Zunahme d. GSI (Gonadosomatischer Index) in Weibchen bei ≥ 4 ng/L, Abnahme d. GSI in Männchen bei ≥ 4 ng/L; Zunahme d. MT-Konz. in Nieren u. Abnahme in Leber bei ≥ 40 ng/L in Männchen u. Weibchen	Werner et al. (2003)

¹: unveröffentlicht; ²: persönliche Mitteilung

Tab. 8.9: In wissenschaftlicher Literatur verfügbare und aus eigenen Untersuchungen hergeleitete Effektdaten zu Tonalid (AHTN).

Testorganismus	Testsystem	Richtlinie	Endpunkt(e)	Testdauer und -bedingungen	Effektkonzentration	Referenz
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Grünalge)	Algenwachstum-inhibitionstest	OECD 201	Zellwachstum, Biomasseproduktion	72 h, statisch; 0,0625-1,0 mg/L	EC ₅₀ Wachstum > 0,797 mg/L EC ₅₀ Biomasse = 0,468 mg/L	van de Plassche & Balk (1997) ¹
<i>Lumbriculus variegatus</i> (Wenigborster)	Akuter Toxizitätstest	-	Immobilisierung	120 h, statisch, nur im Wasser; 0-1,9 µM	EC ₅₀ = 397 µg/L	Artola-Garicano et al. (2003)
<i>Chironomus riparius</i> (Zuckmücke)	Akuter Toxizitätstest	-	Mortalität	96 h, semi-statisch, nur im Wasser; 0-6,6 µM	LC ₅₀ > 460 µg/L	
<i>Arcatia tonsa</i> (Ruderfußkrebs)	Akuter Toxizitätstest	ISO/DIS 14669, 1997	Mortalität	48 h, statisch; 0,03-1 mg/L	LC ₅₀ = 0,71 mg/L	Wollenberger et al. (2003)
<i>Nitocra spinipes</i> (Ruderfußkrebs)	Akuter Toxizitätstest	SIS (SS-02-81-06), 1991	Mortalität	96 h, semi-statisch; 0,13-1,3 mg/L	LC ₅₀ = 0,61 mg/L	Breitholtz et al. (2003)
<i>Nitocra spinipes</i> (Ruderfußkrebs)	Chronischer Toxizitätstest	-	Larvalentwicklung und -mortalität	18 d, semi-statisch; 2-60 mg/L	Keine Effekte	
<i>Eisenia fetida</i> (Regenwurm)	Chronischer Toxizitätstest	ISO 11268 (OECD 207)	Wachstum, Reproduktion, Mortalität	8 Wochen; 8-250 mg/kg Boden	NOEC _{Mort., Wachstum, 4 Wo.} ≥ 250 mg/kg NOEC _{Reproduktion, 8 Wo.} = 105 mg/kg	van de Plassche & Balk (1997) ¹
<i>Folsomia candida</i> (Springschwanz)	Chronischer Toxizitätstest	ISO/CD 11267	Reproduktion, Mortalität	28 d; 1-105 mg/kg Boden	NOEC _{Mort., Reprod.} = 45 mg/kg	
<i>Lumbriculus variegatus</i> (Wenigborster)	Sediment-Toxizität	-	Reproduktion, Biomasse	28 d, statisch; 6,25-100 mg/kg Sediment TG	NOEC = 50 mg/kg EC ₅₀ Biomasse = 80 mg/kg EC ₅₀ Reproduktion = 105 mg/kg	diese Arbeit
<i>Lumbriculus variegatus</i> (Wenigborster)	Biokonzentrationsstudie	-	Biokonzentration	12d, Durchfluss (nur im Wasser); 12 µg/L	BCF _(FG) = 6.918	Artola-Garicano et al. (2003)
<i>Chironomus riparius</i> (Zuckmücke)					BCF _(FG) = 50	
<i>Arcatia tonsa</i> (Ruderfußkrebs)	Subchronischer Toxizitätstest	-	Larvalentwicklung	5 d, semi-statisch; 4-400 µg/L	EC ₅₀ = 26 µg/L	Wollenberger et al. (2003)

Fortsetzung Tab. 8.9

Testorganismus	Testsystem	Richtlinie	Endpunkt(e)	Testdauer und -bedingungen	Effektkonzentration	Referenz
<i>Daphnia magna</i> (Wasserfloh)	Reproduktionstest	OECD 202, Teil II, 1993	Immobilisierung, Reproduktion	21 d, semi-statisch; 0,062-1,0 mg/L	NOEC _{Reproduktion} = 0,196 mg/L EC ₅₀ Immobilität = 0,341 mg/L	van de Plassche & Balk (1997) ¹
<i>Lepomis macrochirus</i> (Blaukiemen-Sonnenbarsch)	Chronischer Toxizitätstest	OECD 204	Reproduktion, Mortalität	21 d, Durchfluss; 0,125-2,0 mg/L	LOEC _{Reproduktion} = 0,205 mg/L NOEC _{Wachstum} = 0,089 mg/L LC ₅₀ = 0,314 mg/L	
<i>Lepomis macrochirus</i> (Blaukiemen-Sonnenbarsch)	Biokonzentrationsstudie	OECD 305E	Biokonzentration	28 d, Durchfluss; 0,99 und 9,81 µg/L	BCF _(FG) = 1.320 (Gesamtradioaktivität) BCF _(FG) = 597 (Ursubstanz)	
<i>Pimephales promelas</i> (Dickkopfelnritze)	„early life stage“-Studie	OECD 210	Schlupf- und Überlebensrate der Laven, Larvalentwicklung und -wachstum	36 d, Durchfluss; 0,0125-0,2 mg/L	LOEC _{Schlupfrate} > 0,14 mg/L NOEC _{Überlebensrate} = 0,067 mg/L LC ₅₀ = 0,1 mg/L NOEC _{Wachstum} = 0,035 mg/L NOEC _{Larvalentwicklung} = 0,035 mg/L	
<i>Anguilla anguilla</i> (Aal)	Biokonzentrations-Monitoring	-	Biokonzentration	Natürliche Bedingungen (wild gefangener Fisch)	BCF _(FG) = 1.069 BCF _(Lipidgehalt) = 5.017	Fromme et al. (2001)
<i>Danio rerio</i> (Zebraabärbling)	Kurzzeittest für endokrine Disruption (<i>Transgenic Zebrafish Assay</i>)	-	Inhibition der Luciferase-Aktivität (Antiöstrogenität)	96 h, semi-statisch; 10 nM Östradiol + 0,01-1 µM AHTN	NOEC = 0,01 µM (=2,58 µg/L) LOEC = 0,1 µM (= 25,8 µg/L)	Schreurs et al. (2004)
			Biokonzentration		BCF ~ 600	

¹: zitiert in: van de Plassche & Balk (1997)

8.3.2 Effektdaten zu SMX

Die Verfügbarkeit von Effektdaten zu SMX ist bisher noch sehr begrenzt. In einem standardisierten Wachstum-inhibitionstest mit *Pseudomonas putida* wurde mit einer $IC_{50} = 256 \text{ mg/L}$ keine Hemmung des Bakterienwachstums bei umweltrelevanten Konzentrationen festgestellt (Al-Ahmad et al., 1999). Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten akuten Toxizitätstests mit Standardorganismen erwies sich die Grünalge *Scenedesmus subspicatus* als der sensitivste Organismus in den Kurzzeitstudien mit einer $EC_{50} = 3,16 \text{ mg/L}$ (Kap. 2.2.1). *Daphnia* und der Zebrafisch zeigten keine Effekte oberhalb von 80 mg/L SMX (Tab. 8.7). In einem Toxizitätstest mit der Wasserlinse *Lemna gibba* zeigte sich die Frondzahl (Anzahl der Blättchen) als sensitivster Endpunkt mit einer $NOEC = 10 \text{ µg/L}$ (Brain et al., 2004). Trotz der relativ kurzen Dauer des *Lemna*-Toxizitätstests (7 d) wird dieses Testsystem als chronischer Test gewertet (EC, 2002), da bei der asexuellen Reproduktionsweise die Generationsdauer äußerst kurz ist. Ergebnisse zu weiteren Langzeitstudien mit SMX liegen nach derzeitigen Erkenntnissen nicht vor.

8.3.3 Effektdaten zu EE2

Auf Grund der seit Mitte der 1990er Jahre gewonnenen Erkenntnis über das große endokrine Potenzial von EE2 gegenüber Fischen (Purdum et al., 1994; Sheahan et al., 1994), wurden mit diesem Steroid vielfache ökotoxikologische Untersuchungen an Vertebraten und Invertebraten durchgeführt. In diversen akuten Toxizitätstests mit Bakterien, Pilzen und Algen zeigte sich die Grünalge *S. subspicatus* als sensitivster Organismus mit einer $EC_{50} = 0,84 \text{ mg/L}$ (Kopf, 1997). In akuten Toxizitätstests mit Crustaceen und Fischen, wobei klassische Endpunkte wie Immobilisierung und Mortalität untersucht wurden, konnten Effektkonzentrationen im oberen µg/L -Bereich nicht unterschritten werden (Kopf, 1997; Schweinfurth et al., 1997; Watts et al., 2001a; Wenzel et al., 2001). Bei der eigenen durchgeführten Sediment-Toxizitätsstudie mit *L. variegatus* wurden ebenfalls keine toxischen Effekte in umweltrelevanten Konzentrationen festgestellt werden (Tab. 8.8, vgl. Kap. 2.2.3).

In einem von der Europäischen Kommission geförderten Projekt (IDEA – „Identification of endocrine disrupting effects in aquatic organisms“) wurden u.a. Invertebraten auf ihre Sensitivität gegenüber östrogen wirksamen Substanzen, darunter auch 17α -Ethinylöstradiol untersucht (Segner et al., 2003a). Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden in separaten Artikeln veröffentlicht (z.B. Pascoe et al., 2002; Watts et al., 2001a, 2001b, 2003; Vandenbergh et al., 2003). Bei dem taxonomisch niederen Organismus *Hydra vulgaris* (Coelenterata, Cnidaria) wurden in einem chronischen Toxizitätstest Beeinträchtigungen verschiedener Geschlechtsparameter bei 500 µg/L festgestellt (Pascoe et al., 2002). Die beobachteten Effekte konnten bei den entsprechenden Konzentrationen allerdings nicht auf die endokrine Wirkungsweise von EE2 zurückgeführt werden. Es wurde vermutet, dass andere physiologische Prozesse dabei eine Rolle spielten. In einer über 2 Generationen andauernden Sediment-Toxizitätsstudie mit *Chironomus riparius* wurde beobachtet, dass sich bei der sehr niedrigen EE2-Konzentration von 1 ng/L die Dauer bis zum Schlupfzeitpunkt signifikant gegenüber den Kontrollen verkürzt hatte (Watts et al., 2001b). Allerdings konnte keine konsistente Dosis-Wirkungsbeziehung festgestellt werden und die Autoren schlussfolgerten, dass *C. riparius* für die Bewertung von östrogenen Effekten kein geeigneter Testorganismus sei. In einer anschließenden Studie (Watts et al., 2003) wurden subletale Effekte von EE2 auf *C. riparius* im Larvalstadium bis zur Verpuppung untersucht. Dabei konnten Verformungen bestimmter Bereiche der Mudwerkzeuge (Mentum) im Konzentrationsbereich zwischen 10 ng/L und 10 µg/L festgestellt werden. Dieser Effekt wurde bei höheren Konzentrationen nicht festgestellt, allerdings wurde bei 1 mg/L die Häutung beeinflusst und die Biomasseproduktion herabgesetzt. Die Ergebnisse dieser beiden Studien verdeutlichen, dass die Auswahl der zu bestimmenden Endpunkte entscheidend für die Feststellung spezifischer Effekte von Pharmazeutika, insbesondere für hormonell wirksame Substanzen ist. Interessanterweise konnte bei einer vergleichbaren Studie von Meregalli et al. (2001) bei Konzentrationen bis 100 µg EE2/L während einer Expositionsdauer von 9 Tagen keine Effekte wie Verformungen von Mudwerkzeugen bei *C. riparius* festgestellt werden. In einer Multigenerationsstudie mit dem Bachflohkrebs *Hyaella azteca* wurden bei der 2. Generation histologische Veränderungen der Gonaden bei 100 und 320 ng/L festgestellt, allerdings nicht in höheren Konzentrationen (Vandenbergh et al., 2003). Bei der Spitzschlamm Schnecke *Lymnaea stagnalis* wurden in chronischen Studien Veränderungen im Proteinstoffwechsel und verringertes Wachstum von Juvenilen bei 50 - 500 ng/L nachgewiesen (Segner et al., 2003a). Bereits Kurzzeit-Exposition gegenüber EE2 verursachte bei juvenilen und adulten Schnecken Reduktion der Verkalkung des Schneckengehäuses und Anomalien der Geschlechtsorgane.

In einer Reproduktionsstudie mit *Daphnia magna* wurde eine $EC_{50} = 105 \text{ µg/L}$ bestimmt (Kopf, 1997). In einer entsprechenden Studie von Schweinfurth et al. (1997) konnten allerdings bei Konzentrationen zwischen 19 µg/L

und 387 µg/L keine Effekte auf die Reproduktion von *D. magna* festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Reproduktion von *D. magna* nicht durch östrogen wirksame Substanzen kontrolliert und beeinflusst wird.

Auf die bereits oben erwähnten durchgeführten Studien mit EE2 an Fischen (Purdom et al., 1994; Sheahan et al., 1994) folgten in den vergangenen 10 Jahren vielfache chronische Toxizitätsstudien und „life-cycle“-Studien, aber auch *in vitro*-Untersuchungen zur endokrinen Wirksamkeit von EE2 (Tab. 8.8). Durch die meisten dieser Studien wurde das zuerst bei der Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* festgestellte endokrine Potenzial von EE2 auch bei anderen Fischarten wie *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas* und *Leuciscus idus* bestätigt. Dabei diente häufig die in männlichen Fischen vermehrte Bildung von Vitellogenin (VTG), dem Vorläufer des Eidotterproteins Lipovitellin, als Endpunkt und Biomarker zum Nachweis östrogen wirksamer Substanzen. Erhöhte VTG-Konzentrationen im Plasma oder Ganzkörperhomogenat wurden bei der Dickkopfelritze nach 21 d Exposition bei 1 ng/L (Jobling et al., 2004; Pawlowski et al., 2004), beim Zebraäbrbling nach 21 d bei 1,67 ng/L (Fenske et al., 2001), bei der Regenbogenforelle nach 21 d bei 2 ng/L (Jobling et al., 1996) und bei der Goldorfe nach 10 d Exposition bei 6 ng/L (Allner et al., 1999) festgestellt. Bei den Studien von Purdom et al. (1994) und Sheahan et al. (1994) waren die Analysemethoden für EE2 noch weniger fortgeschritten und nur in sehr beschränktem Umfang durchgeführt worden, weshalb die sehr niedrigen Effektdaten mit Vorsicht in einer Risikobetrachtung verwendet werden sollten.

Durch verschiedene chronische Studien über zum Teil mehrere Generationen wurde bestätigt, dass die erhöhte VTG-Konzentration bei männlichen Fischen ein Indiz auf die Herabsetzung der Reproduktionsleistung sein kann (z.B. Wenzel et al., 1999; Segner et al., 2003b; Schweinfurth et al., 1997). Umweltrelevante Konzentrationen im unteren ng/L-Bereich reichten dabei aus, um Befruchtungsraten herabzusetzen oder histologische Veränderungen der Gonaden und Ausbildungen von Intersex hervorzurufen (Balch et al., 2004; Nash et al., 2004). In der Multi-generationsstudie von Wenzel et al. (1999) wurde für die Befruchtungsrate von *Danio rerio* eine NOEC = 0,3 ng EE2/L festgestellt. Durch die hochsensible Analysemethode mittels GC-MS/MS und den angemessenen Probenumfang kann das Ergebnis dieser Studie als repräsentativ betrachtet werden, weshalb der Wert für die Herleitung des PNEC basierend auf chronischen Effektdaten herangezogen wird (vgl. Kap. 4.4).

Daten zur Bioakkumulation von EE2 liegen bisher lediglich für die Dickkopfelritze *P. promelas* und für den Sedimentbewohner *L. variegatus* vor. In einer *life-cycle*-Studie von Länge et al. (2001) wurde in unterschiedlich alten Fischen und bei verschiedenen Konzentrationen Biokonzentrationsfaktoren von 610 und 660 gemessen. Allerdings zeigten die Tiere Anzeichen von toxischen Effekten, weshalb diese Werte nur bedingt in einer Umwelttrisikobewertung zu verwenden wären. In einer eigenen Sediment-Bioakkumulationsstudie mit *L. variegatus* wurde nach einer 35-tägigen Aufnahmephase ein auf den Lipidgehalt der Würmer und OC-Gehalt des Sediments normierter Akkumulationsfaktor von 75 bestimmt (s. Kap. 2.2.4). Dabei wurde kein *steady state* erreicht sondern die Akkumulation von EE2 tendierte weiter anzusteigen.

8.3.4 Effektdaten zu AHTN

Im Rahmen einer Umwelttrisikobewertung nach den Vorgaben des TGD (EC, 1996) wurden Effektdaten aus Kurzzeit- und Langzeitstudien an Standardorganismen unterschiedlicher Umweltkompartimente herangezogen (van de Plassche & Balk, 1997). Für die Herleitung der PNEC für das aquatische Kompartiment wurden die Resultate einer „early life stage“-Studie an der Dickkopfelritze *Pimephales promelas* zu Grunde gelegt, bei welcher für die Parameter Entwicklung und Wachstum der Larven eine NOEC = 0,035 mg/L bestimmt wurde. In einer eigenen Sediment-Toxizitätsstudie mit *L. variegatus* (s. Kap. 2.2.3) wurde bezüglich der Parameter Biomasseproduktion und Reproduktion eine NOEC = 50 mg/kg TG Sediment festgestellt. Bei einem akuten Toxizitätstest in einem „Nur-Wasser-Testsystem“ (ohne Sediment) untersuchten Artola-Garicano et al. (2003) die Auswirkungen von AHTN auf die Immobilisierung von *L. variegatus* und bestimmten dabei eine $EC_{50} = 397 \mu\text{g/L}$. Wollenberger et al. (2003) stellten in einem subchronischen Toxizitätstest mit dem marinen Ruderfußkrebs *Arctia tonsa* für die Hemmung der Larvalentwicklung eine $EC_{50/5 \text{ d}} = 0,026 \text{ mg/L}$ fest (Tab. 8.9).

Das hohe Akkumulationspotenzial von AHTN wurde durch eine Biokonzentrationsstudie von Artola-Garicano et al. (2003) *L. variegatus* bestätigt, bei der ein BCF bezogen auf das FG von 6.918 bestimmt wurde. Auch in wild gefangenen Aal (*Anguilla anguilla*) wurden von Fromme et al. (2001) hohe Biokonzentrationsfaktoren bis zu einen auf den Lipidgehalt normierten BCF = 5.017 gemessen.

8.4 Rohdaten und statistische Auswertungen zu den durchgeführten Studien

Tab. 8.10: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Algenzell-dichte in allen Replikaten der Prüfkonzentrationen über den Prüfzeitraum von 96 h (je 2 Zählungen pro Replikat).

Nominale Testkonzentration [mg/L]	Replikat	Zellzahl x 10 ⁴ /mL			
		24 h	48 h	72 h	96 h
0	C0.1	3	6	69	164
		2	7	49	181
	C0.2	6	11	47	166
		6	16	60	202
	C0.3	5	11	38	190
		2	11	20	224
2,5	C1.1	2	13	23	151
		2	17	21	156
	C1.2	1	6	55	208
		3	11	37	178
	C1.3	2	5	16	128
		1	5	19	162
5	C2.1	3	5	7	3
		4	3	3	10
	C2.2	5	5	7	3
		2	2	7	12
	C2.3	1	0	9	3
		1	8	9	6
10	C3.1	1	5	5	4
		3	3	3	3
	C3.2	1	3	2	1
		2	4	5	5
	C3.3	1	2	3	1
		0	5	4	2
20	C4.1	1	4	3	1
		1	2	1	1
	C4.2	6	1	2	5
		3	2	4	1
	C4.3	1	4	3	2
		3	2	3	2
40	C5.1	2	1	2	4
		2	2	1	3
	C5.2	1	2	2	1
		3	2	1	1
	C5.3	1	1	2	1
		1	1	1	1
70	C6.1	3	0	1	1
		1	2	2	1
	C6.2	2	0	2	1
		1	0	3	1
	C6.3	3	1	1	8
		1	0	3	3
100	C7.1	1	3	0	0
		2	1	0	3
	C7.2	0	1	3	0
		3	2	0	2
	C7.3	3	1	0	3
		2	1	0	2

Tab.8.11: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Zellvermehrung nach 72 h und 96 h Exposition (Zellzahlintegral) – Probit-Analyse (*Originaltabelle* aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Probit analysis using Linear Max. Likelihood Regression: Determination of the concentration/response function; data is shown which entered the Probit analysis; Log(x): logarithm of the concentration; n: number of organisms; Emp. Probit: working probits; Reg. Probit: calculated probits for the final function.*

Expositionszeit	Treatment [mg/L]	Log(x)	%Decrease	n	Emp. Probit	Weight	Reg. Probit
72 h	Control		0.0	3			excluded
	2.5	0.398	34.82	3	4.613	0.910	4.695
	5.0	0.699	78.82	3	5.798	0.701	5.593
	10.0	1.000	87.76	3	6.162	0.106	6.498
	20.0	1.301	89.18	3	6.234	0.003	7.403
	40.0	1.602	96.00	3	6.751	0.000	8.307
96 h	Control		0.0	3			excluded
	2.5	0.398	22.16	3	4.236	0.556	4.236
	5.0	0.699	91.39	3	6.364	0.156	6.361
	10.0	1.000	95.72	3	6.719	0.000	8.493
	20.0	1.301	96.60	3	6.825	0.000	8.722
	40.0	1.602	98.63	3	7.206	0.000	1.278

excluded: value not in line with the chosen function

Tab. 8.12: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Zellvermehrung nach 72 h und 96 h Exposition (Zellzahlintegral) – Probit-Analyse (*Originaltabelle* aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Parameters of the Probit analysis: Results of the regression analysis.*

Parameter	Value (72 h)	Value (96 h)
Computation runs:	15	6
Slope b:	2.9992	7.0699
Intercept a:	3.4994	1.4203
Variance of b:	16.7559	90.3595
Goodness of Fit		
Chi ² :	0.1238	6.1307
Degrees of freedom:	3	3
p(Chi ²):	0.9888	0.1054
Log EC50:	0.5003	0.5063
s Log EC50:	16.1659	1.6810
g-Criterion:	0.7780	37.4051
Residual Variance (Chi ² /df):	0.0413	2.0436
r ² :	0.8130	0.0830
F:	13.0140	0.2710
p(F) (df: 1;3):	0.0370	0.3610

Chi² is a goodness of fit measure. If the probability, p(Chi²), is lower or equal 0.001, data is much scattering round the computed dose/response function. In this case and with quantal data, confidence limits are corrected for heterogeneity (= are made wider; so, check whether these results are reasonable!). The coefficient of determination, r² (0 ≤ r² ≤ 1), gives the proportion of variance explained by the dose/response function. F-Test for regression: Ho: Slope = 0; hence, if p(F) ≤ alpha, the selected significance level, (e.g., alpha = 0.05) the regression revealed significant results (= slope is significantly different from zero).

Tab. 8.13: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Zellvermehrung nach 72 h und 96 h Exposition (Zellzahlintegral) – Probit-Analyse (Originaltabelle aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Results of the Probit analysis: Selected effective concentrations (ECx) of the test item and their 95%-confidence limits.*

Expositionszeit	Parameter	EC10	EC20	EC50
72 h	Value [mg/L]	1.18	1.66	3.16
	lower 95%-cl	0.00	0.00	0.75
	upper 95%-cl	2.15	2.65	5.17
96 h	Value [mg/L]	2.11	2.44	3.21
	lower 95%-cl	n.d.	n.d.	n.d.
	upper 95%-cl	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.: not determined due to mathematical reasons;

computation of variances and confidence limits was adjusted to metric data (Christensen & Nyholm 1984). Slope function after Litchfield and Wilcoxon: 2.155 (72 h) and 1.385 (96 h) (The slope function is derived from the slope, b, of the linearized probit function and computes as $S = 1/(10^b)$; please note that small values refer to a steep dose/response relation and large ones to a flat relation.)

Tab. 8.14: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Wachstumsrate nach 72 h und 96 h Exposition – Probit-Analyse (Originaltabelle aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Probit analysis using Linear Max. Likelihood Regression: Determination of the concentration/response function; data is shown which entered the Probit analysis; Log(x): logarithm of the concentration; n: number of organisms; Emp. Probit: working probits; Reg. Probit: calculated probits for the final function.*

Expositionszeit	Treatment [mg/L]	Log(x)	%Decrease	n	Emp. Probit	Weight	Reg. Probit
72 h	Control		0.0	3			excluded
	2.5	0.398	14.38	3	3.939	0.580	4.265
	5.0	0.699	49.65	3	4.991	0.956	4.790
	10.0	1.000	65.93	3	5.408	0.905	5.313
	20.0	1.301	74.70	3	5.662	0.492	5.840
	40.0	1.602	89.35	3	6.244	0.154	6.368
96 h	Control		0.0	3			excluded
	2.5	0.398	2.71	3	3.074	0.579	4.264
	5.0	0.699	65.66	3	5.401	0.999	5.034
	10.0	1.000	82.44	3	5.930	0.520	5.806
	20.0	1.301	88.59	3	6.203	0.082	6.581
	40.0	1.602	92.02	3	6.405	0.004	7.357

excluded: value not in line with the chosen function

Tab. 8.15: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Wachstumsrate nach 72 h und 96 h Exposition – Probit-Analyse (Originaltabelle aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Parameters of the Probit analysis: Results of the regression analysis.*

Parameter	Value (72 h)	Value (96 h)
Computation runs:	3	2
Slope b:	1.7497	3.3319
Intercept a:	3.5664	2.6842
Variance of b:	2.8884	7.5784
Goodness of Fit		
Chi ² :	0.1158	0.3690
Degrees of freedom:	3	3
p(Chi ²):	0.9899	0.9466
Log EC50:	0.8193	0.6950
s Log EC50:	6.9571	2.6881
g-Criterion:	0.3687	0.8502
Residual Variance (Chi ² /df):	0.0386	0.1230
r ² :	0.9020	0.7990
F:	27.4630	11.9090
p(F) (df: 1;3):	0.0140	0.0410

Chi² is a goodness of fit measure. If the probability, p(Chi²), is lower or equal 0.001, data is much scattering round the computed dose/response function. In this case and with quantal data, confidence limits are corrected for heterogeneity (= are made wider; so, check whether these results are reasonable!). The coefficient of determination, r² (0 ≤ r² ≤ 1), gives the proportion of variance explained by the dose/response function. F-Test for regression: Ho: Slope = 0; hence, if p(F) ≤ alpha, the selected significance level, (e.g., alpha = 0.05) the regression revealed significant results (= slope is significantly different from zero).

Tab. 8.16: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Wachstumsrate nach 72 h und 96 h Exposition – Probit-Analyse (Originaltabelle aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Results of the Probit analysis: Selected effective concentrations (ECx) of the test item and their 95%-confidence limits.*

Expositionszeit	Parameter	EC10	EC20	EC50
72 h	Value [mg/L]	1.22	2.19	6.60
	lower 95%-cl	0.07	0.29	3.37
	upper 95%-cl	2.67	3.99	11.21
96 h	Value [mg/L]	2.05	2.77	4.96
	lower 95%-cl	n.d.	0.00	0.96
	upper 95%-cl	3.74	4.71	15.13

n.d.: not determined due to mathematical reasons;

computation of variances and confidence limits was adjusted to metric data (Christensen & Nyholm 1984). Slope function after Litchfield and Wilcoxon: 3.728 (72 h) and 1.996 (96 h) (The slope function is derived from the slope, b, of the linearized probit function and computes as $S = 1/(10^b)$; please note that small values refer to a steep dose/response relation and large ones to a flat relation.)

Tab. 8.17: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Zellvermehrung – Test auf Homogenität der Varianzen nach Cochran (Originaltabelle aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Cochran's Test Procedure on Variance Homogeneity: Homogeneity of variance is tested (Alpha = 0.05); var: variance; n: sample size; G*: critical limit for G_max; dfm: degrees of freedom for the multiple test procedure; homogeneity hypothesis is rejected if G_max > G*.*

Treatment [mg/L]	n	72 h var	96 h var
Control	3	42996	47244
2.5	3	50484	475236
5.0	3	144	624
10.0	3	732	1764
20.0	3	912	2352
40.0	3	624	1164
G_max = 0.5; dfm = 3; G* = 0.68; G_max = 0.9; dfm = 3; G* = 0.68; G_max G* > G_max: homogeneity hyp. is accepted. > G*: homogeneity hypothesis is rejected.			

Tab. 8.18: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Zellvermehrung – Mehrfachvergleich Bonferroni t-Test (Welch-Test für inhomogene Varianzen mit einer Angleichung nach Bonferroni) nach 72 h und 96 h Expositionszeit (*Originaltabelle* aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Welch-t test for Inhomogeneous Variances with Bonferroni Adjustment: Multiple sequentially rejective comparisons after Welch of treatments with "Control" by the t test procedure. Significance was Alpha = 0.05, one-sided smaller; Mean: arithmetic mean; n: sample size; s²: variance; %MDD: minimum detectable difference to Control (in percent of Control); t: sample t; p(t): probability of sample t for Ho: $\mu_1 = \mu_2$; Alpha(i): adjusted significance levels; the differences are significant in case $p(i) \leq \text{Alpha}(i)$; dfm: modified degrees of freedom due to heteroscedascity. (The residual variance of an ANOVA was applied; $df = N - k$; N: sum of treatment replicates $n(i)$; k: number of treatments).*

Expositionszeit	Treatment [mg/L]	Mean	s ²	df	%MDD	t	p(t)	Alpha(i)	Sign.
72 h	Control	850	15982						
	2.5	554	15982	8	-22.6	-2.87	0.010	0.050	+
	5.0	180	15982	601	-23.9	-6.49	< 0.001	0.025	+
	10.0	104	15982	122	-26.1	-7.23	< 0.001	0.017	+
	20.0	92	15982	98	-27.7	-7.34	< 0.001	0.013	+
	40.0	34	15982	142	-28.6	-7.91	< 0.001	0.010	+
96 h	Control	3646	88064						
	2.5	2838	88064	24	-11.4	-3.33	0.001	0.050	+
	5.0	314	88064	155	-14.3	-13.75	< 0.001	0.017	+
	10.0	156	88064	58	-15.3	-14.4	< 0.001	0.013	+
	20.0	124	88064	44	-13.4	-14.54	< 0.001	0.025	+
	40.0	50	88064	85	-15.8	-14.84	< 0.001	0.010	+

72 h, 96 h: The NOEC is lower than 2.5 mg/L.

Tab. 8.19: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Zellvermehrung – Übersicht über die LOEC- und NOEC-Bestimmung nach 72 h und 96 h Expositionszeit mittels dem Bonferroni t-Test (*Originaltabelle* aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Overview over the LOEC and NOEC Determination by Bonferroni t-Test (inhomog. Var.).*

Treatment [mg/L]	0-72 h	0-96 h
2.5	< 0.001+	< 0.001+
5.0	< 0.001+	< 0.001+
10.0	< 0.001+	< 0.001+
20.0	< 0.001+	< 0.001+
40.0	< 0.001+	< 0.001+
LOEC	< 2.50	< 2.50
NOEC	< 2.50	< 2.50

+: Significant difference to control ($p \leq 0.05$)

Tab. 8.20: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Wachstumsrate – Test auf Homogenität der Varianzen nach Cochran (*Originaltabelle* aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Cochran's Test Procedure on Variance Homogeneity: Homogeneity of variance is tested (Alpha = 0.05); var: variance; n: sample size; G*: critical limit for G_max; dfm: degrees of freedom for the multiple test procedure; homogeneity hypothesis is rejected if $G_{\text{max}} > G^*$.*

Treatment [mg/L]	n	72 h var	96 h var
Control	3	0.016	0.001
2.5	3	0.028	0.001
5.0	3	0.010	0.004
10.0	3	0.001	0.013
20.0	3	0.006	0.019
		$G_{\text{max}} = 0.463$; $dfm = 2$; $G^* = 0.88$; $G^* > G_{\text{max}}$: homogeneity hyp. is accepted.	$G_{\text{max}} = 0.503$; $dfm = 2$; $G^* = 0.88$; $G_{\text{max}} > G^*$: homogeneity hyp. is rejected.

Tab. 8.21: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Wachstumsrate – Mehrfachvergleich Bonferroni t-Test (Welch-Test für inhomogene Varianzen mit einer Angleichung nach Bonferroni) nach 72 h und 96 h Expositionszeit (*Originaltabelle* aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Welch-t test for Inhomogeneous Variances with Bonferroni Adjustment: Multiple sequentially rejective comparisons after Welch of treatments with "Control" by the t test procedure. Significance was Alpha = 0.05, one-sided smaller; Mean: arithmetic mean; n: sample size; s²: variance; %MDD: minimum detectable difference to Control (in percent of Control); t: sample t; p(t): probability of sample t for Ho: $\mu_1 = \mu_2$; Alpha(i): adjusted significance levels; the differences are significant in case $p(i) \leq \text{Alpha}(i)$; dfm: modified degrees of freedom due to heteroscedascity.*

Expositionszeit	Treatment [mg/L]	Mean	s ²	df	%MDD	t	p(t)	Alpha(i)	Sign.
72 h	Control	1.269	0.012						
	2.5	1.087	0.012	9	-13.045	-2.02	0.037	0.050	+
	5.0	0.639	0.012	9	-16.099	-6.98	< 0.001	0.025	+
	10.0	0.432	0.012	54	-16.419	-9.26	< 0.001	0.013	+
	20.0	0.321	0.012	10	-17.57	-10.5	< 0.001	0.017	+
96 h	Control	1.308	0.008						
	2.5	1.273	0.008	10	-9.902	-0.5	0.316	0.050	-
	5.0	0.449	0.008	20	-13.251	-12.02	< 0.001	0.013	+
	10.0	0.230	0.008	52	-10.968	-15.09	< 0.001	0.025	+
	20.0	0.149	0.008	76	-11.849	-16.21	< 0.001	0.017	+

72 h: The NOEC is lower than 2.5 mg/L; 96 h: A NOEC of 2.50 mg/L is suggested by the program.

Tab. 8.22: Algenwachstum-inhibitionstest mit SMX: Wachstumsrate – Übersicht über die LOEC- und NOEC-Bestimmung nach 72 h und 96 h Expositionszeit mittels dem Bonferroni t-Test (*Originaltabelle* aus ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions GmbH, 2004)): *Overview over the LOEC and NOEC Determination by Bonferroni t-Test (inhomog. Var.).*

Treatment [mg/L]	0-72 h	0-96 h
2.5	< 0.001+	< 0.001 -
5.0	< 0.001+	< 0.001+
10.0	< 0.001+	< 0.001+
20.0	< 0.001+	< 0.001+
LOEC	< 2.50	5.00
NOEC	< 2.50	2.50

+: Significant difference to control ($p \leq 0.05$)

Tab. 8.23: Daphnien-Toxizitätstest mit SMX: Anzahl mobiler Daphnien in allen Testkonzentrationen und Kontrollen nach 24 h und 48 h Exposition.

Nominale Konzentration [mg/L]	Replik	Anzahl Daphnien je Replik zu Testbeginn	Anzahl mobiler Daphnien nach:	
			24 h	48 h
0	C0.1	5	0	0
0	C0.2	5	0	0
0	C0.3	5	0	0
0	C0.4	5	0	0
5	C1.1	5	0	0
5	C1.2	5	0	0
5	C1.3	5	0	0
5	C1.4	5	0	0
10	C2.1	5	0	0
10	C2.2	5	0	0
10	C2.3	5	0	1
10	C2.4	5	0	0
20	C3.1	5	0	0
20	C3.2	5	0	0
20	C3.3	5	0	0
20	C3.4	5	0	0
40	C4.1	5	0	0
40	C4.2	5	0	0
40	C4.3	5	0	0
40	C4.4	5	0	0
80	C5.1	5	0	0
80	C5.2	5	0	0
80	C5.3	5	0	0
80	C5.4	5	0	0
160	C6.1	5	3	3
160	C6.2	5	4	4
160	C6.3	5	3	5
160	C6.4	5	5	5

Tab. 8.24: Akuter Fisch-Toxizitätstest mit SMX: Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Temperatur in allen Testlösungen während des Testzeitraums.

Nominale Konzentration [mg/L]	Zeitpunkt [h]	O ₂ -Gehalt		Temperatur [°C]	pH
		[mg/L]	[%]		
0	0	9,1	100	25,6	7,9
100	0	9,2	100	25,7	7,3
0	24	8,9	100	25,7	7,8
100	24	9,0	100	25,7	7,4
0	48	8,9	100	25,6	7,7
100	48	9,0	100	25,6	7,4
0	72	8,8	100	25,7	7,7
100	72	8,9	100	25,7	7,5
0	96	8,7	100	25,7	7,7
100	96	8,8	100	25,7	7,5

Tab. 8.25: Akuter Fisch-Toxizitätstest mit CBZ: Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Temperatur in allen Testlösungen während des Testzeitraums.

Nominale Konzentration [mg/L]	Zeitpunkt [h]	O ₂ -Gehalt		Temperatur [°C]	pH
		[mg/L]	[%]		
0	0	9,0	110	25,8	7,8
6,25	0	9,1	111	25,8	7,8
12,5	0	9,1	112	25,9	7,8
25	0	9,0	111	26,0	7,8
50	0	9,1	112	25,9	7,8
100	0	9,0	112	26,1	7,8
0	24	8,7	107	25,9	7,4
6,25	24	8,7	107	25,8	7,3
12,5	24	8,8	108	25,9	7,4
25	24	8,6	106	26,1	7,4
50	24	8,8	108	26,0	7,4
100	24	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
0	48	8,6	105	25,6	7,4
6,25	48	8,5	104	25,8	7,4
12,5	48	9,0	110	25,8	7,4
25	48	8,6	106	25,9	7,4
50	48	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
100	48	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
0	72	8,3	101	25,8	7,4
6,25	72	8,2	100	25,9	7,4
12,5	72	8,7	107	25,9	7,5
25	72	8,1	100	26,0	7,4
50	72	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
100	72	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
0	96	9,8	118	24,5	7,5
6,25	96	9,1	109	24,4	7,4
12,5	96	9,6	114	24,4	7,5
25	96	9,3	111	24,3	7,5
50	96	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
100	96	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

n. a.: nicht ausgewertet (C4 und C5 wurden im Testverlauf bereits aufgelöst)

Tab. 8.26: Fischembryo-Toxizitätstest mit SMX: Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Temperatur in den Testlösungen bei Testbeginn und bei Testende.

Nominale Konzentration [mg/L]	Zeitpunkt [h]	O ₂ -Gehalt		Temperatur [°C]	pH
		[mg/L]	[%]		
0	0	9,5	110	23,5	7,5
100	0	9,1	108	25,4	7,2
0	48	7,6	92	25,5	7,5
100	48	7,7	95	25,7	7,5

Tab. 8.27: Fischembryo-Toxizitätstest mit CBZ: Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Temperatur in allen Testlösungen bei Testbeginn und bei Testende.

Nominale Konzentration [mg/L]	Zeitpunkt [h]	O ₂ -Gehalt		Temperatur [°C]	pH
		[mg/L]	[%]		
0	0	8,7	110	26,7	7,8
6,25	0	8,8	108	27,0	7,8
12,5	0	8,2	102	26,9	7,8
25	0	8,3	103	26,9	7,7
50	0	8,1	101	26,8	7,7
100	0	7,9	99	26,8	7,6
0	48	7,6	93	26,2	7,5
6,25	48	7,8	96	26,3	7,5
12,5	48	7,7	95	26,3	7,5
25	48	7,5	91	26,3	7,5
50	48	7,5	92	26,2	7,5
100	48	7,3	89	26,3	7,5

Tab. 8.28: Fischembryo-Toxizitätstest mit SMX: Herzfrequenz [min⁻¹] von jeweils 4 zufällig ausgewählten Fischembryonen in den Testkonzentrationen nach ca. 48 h Expositionsdauer. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Nominale Konzentration [mg/L]	Replikat	Embryo 1	Embryo 2	Embryo 3	Embryo 4	MW (SD)	Gesamt- MW (SD)
0	C0.1	147	168	165	168	162 (10)	168 (8)
0	C0.2	180	168	165	165	170 (7)	
0	C0.3	168	162	168	180	170 (8)	
0	C0.4	177	168	168	171	171 (4)	
100	C1.1	153	159	153	186	163 (16)	173 (10)
100	C1.2	174	174	177	171	174 (2)	
100	C1.3	177	180	180	171	177 (4)	
100	C1.4	183	177	174	183	179 (5)	

Tab. 8.29: Fischembryo-Toxizitätstest mit CBZ: Anzahl geschlüpfter Larven nach 96 h Expositionszeit in allen Kontrollen und Konzentrationen.

Nominale Konzentration [mg/L]	0	6,25	12,5	25	50	100
Replikat 1	11	6	7	5	0	0
Replikat 2	6	5	3	0	0	0
Summe geschlüpfter Larven (96 h)	17	11	10	5	0	0

Tab. 8.30: Fischembryo-Toxizitätstest mit CBZ: Signifikanztest *Fisher's Exact Binomial Test*; Parameter: Schlupfrate nach 96 h Expositionsdauer; verwendetes Programm: ToxRat Professional Version 2.07 (ToxRat Solutions GmbH, 2003). Eine Kompensation des Kontrolleffekts wurde mit der *Abbott's formula* durchgeführt. Originaltabelle: "Fisher's Exact Binomial Test (alpha is 0.05; one-sided greater): Pair-wise comparisons between treatment and control to test whether mortality increases with increasing concentration. Ho (no effect) is accepted, if the probability $p(\text{exact}) > \text{Alpha}$."

Concentration [mg/L]	Introduced	Hatched	Not hatched	%Effect	$p(\text{exact})$	Significance
Control	40	17	23	57.5		
6.25	40	11	29	72.5	0.241	-
12.5	40	10	30	75.0	0.155	-
25	40	5	35	87.5	0.005	+
50	40	0	40	100	< 0.001	+
100	40	0	40	100	< 0.001	+

+: significant; -: non-significant; The prerequisites for the corresponding Chi²-test are fulfilled.

Tab. 8.31: Fischembryo-Toxizitätstest mit CBZ: Schlupfrate – Probit-Analyse (Originaltabelle aus ToxRat Professional Version 2.07 (ToxRat Solutions GmbH, 2003)): *Probit analysis using Linear Max. Likelihood Regression: Determination of the concentration/response function; data is shown which entered the Probit analysis; Log(x): logarithm of the concentration; n: number of organisms; Emp. Probit: working probits.*

Treatment [mg/L]	Log(x)	%Mortality	n	Emp. Probit	Weight	Probit
Control		0.0	40			excluded
6.25	0.796	35.3	40	4.623	1.946	4.026
12.5	1.100	41.2	40	4.777	6.552	4.925
25	1.400	70.6	40	5.541	7.335	5.823
50	1.700	100.0	40	8.719	3.340	6.722
100	2.000	100.0	40	8.719	0.643	7.621

excluded: value not in line with the chosen function; inhibitions lower equal 0% or greater equal 100% were replaced by 0.01 and 99.99, respectively; with treatments, mortality was corrected by control mortality using Abbott's formula.

Tab. 8.32: Fischembryo-Toxizitätstest mit CBZ: Schlupfrate – Probit-Analyse (Originaltabelle aus ToxRat Professional Version 2.07 (ToxRat Solutions GmbH, 2003)): *Parameters of the Probit analysis: Results of the regression analysis as conducted according to the max. likelihood principle*

Parameter	Value
Iteration cycles:	8
Slope b:	2.986
Intercept a:	1.649
Variance of b:	0.595
Goodness of Fit	
Chi ² :	2.777
Degrees of freedom:	3
p(Chi ²):	0.427
Log EC(D)50:	0.602
Variance Log EC(D)50:	0.013
F:	16.187
p(F) (df: 1;1):	0.028

Chi² is a goodness of fit measure. If the probability, p(Chi²), is lower or equal 0.001, data is much scattering round the computed dose/response function. In this case and with quantal data, confidence limits are corrected for heterogeneity (= are made wider; so, check whether these results are reasonable!).

Tab. 8.33: Fischembryo-Toxizitätstest mit CBZ: Schlupfrate – Probit-Analyse, Originaltabelle aus ToxRat Professional Version 2.07 (ToxRat Solutions GmbH, 2003): *Results of the Probit analysis: Selected effective concentrations (EC_x) of the test item and their 95%- and 99%-confidence limits*

Parameter	EC10	EC20	EC30	EC50	EC70	EC90
Value [mg/L]	4.938	6.939	8.863	13.251	19.812	35.557
lower 95%-cl	2.231	3.648	5.156	8.850	14.104	22.878
upper 95%-cl	10.929	13.198	15.234	19.841	27.830	55.262
lower 99%-cl	1.738	2.981	4.349	7.796	12.676	19.918
upper 99%-cl	14.029	16.153	18.061	22.525	30.967	63.477

n.d.: not determined due to mathematical reasons;

Inhibitions lower equal 0% or greater equal 100% were replaced by 0.01 and 99.99, respectively. With treatments, mortality was corrected by control mortality using Abbott's formula. Please note: The EC90 is extrapolated. Please check, whether the values are reasonable ... Slope function after Litchfield and Wilcoxon: 2.162 (The slope function is derived from the slope, b, of the linearized probit function and computes as $S = 1/(10^b)$; please note that small values refer to a steep dose/response relation and large ones to a flat relation.)

Tab. 8.34: Fischembryo-Toxizitätstest mit CBZ: Herzfrequenz [min^{-1}] von 8 in den Kontrollen und 4 in den Testkonzentrationen zufällig ausgewählten Fischembryonen nach ca. 96 h Expositionsdauer. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Nominale Konzentration [mg/L]	Embryo 1	Embryo 2	Embryo 3	Embryo 4	MW (SD)
0	210 195	186 204	189 216	186 189	197 (12)
6,25	183	192	198	204	194 (9)
12,5	198	204	186	204	198 (8)
25	186	186	195	189	189 (4)
50	162	186	177	132	164 (24)
100	96	78	105	114	98 (15)

Tab. 8.35: Fischembryo-Toxizitätstest mit CBZ: Mehrfachvergleich der Herzfrequenzen [min^{-1}] der Embryonen in den Kontrollen und in den Testkonzentrationen nach Williams; *Originaltabelle* aus ToxRat Professional Version 2.07 (ToxRat Solutions GmbH, 2003): *Multiple comparisons between treatments and "Control" by the t test procedure after Williams. Significance was Alpha = 0.05, one-sided smaller; Mean: arithmetic mean; n: sample size; s: standard deviation; LhM: max. likelihood mean; %LSD: least significant difference to Control (in percent of Control); t: sample t; t*: critical t for $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$; the differences are significant in case $|t| > |t^*|$ (The residual variance of an ANOVA was applied; $df = N - k$; N: sum of treatment replicates $n(i)$; k: number of treatments).*

Treatment [mg/L]	Mean	s	df	LhM	%LSD	t	t*	Significance
Control	196.875	13.2341	22					
6.25	194.250	13.2341	22	196.125	7.068	-0.09	-1.72	-
12.5	198.000	13.2341	22	196.125	7.340	-0.09	-1.78	-
25.0	189.000	13.2341	22	189.000	7.430	-0.97	-1.81	-
50.0	164.250	13.2341	22	164.250	7.463	-4.03	-1.81	+
100.0	98.250	13.2341	22	98.250	7.496	-12.17	-1.82	+

+: significant; -: non-significant; A NOEC of 25.0 mg/L is suggested by the program.

Tab. 8.36: Daphnien-Reproduktionstest mit CBZ: Durchschnittliche Sauerstoffgehalte, pH-Werte und Temperaturen pro Testkonzentration in den frischen Testlösungen bei Mediumwechsel und in den verbrauchten Testlösungen während des Testzeitraums. MW = Mittelwert pro Konzentration, SD = Standardabweichung, Min. = minimal gemessener Wert, Max. = maximal gemessener Wert, N = Anzahl Messungen.

Nominale Konzentration [mg/L]		pH		O ₂ [mg/L]		O ₂ [%]		Temp. [°C]	
		v.	f.	v.	f.	v.	f.	v.	f.
0	MW	7,8	7,9	9,0	8,7	101	98	20,4	21,1
	SD	0,1	0,0	0,4	0,2	4,9	1,3	0,4	0,4
	Min	7,7	7,9	8,6	8,4	96	96	20,0	20,5
	Max	7,9	8,0	9,9	9,0	111	100	21,1	22
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
0,4	MW	7,8	8,0	9,1	8,7	102	98	20,4	20,5
	SD	0,1	0,1	0,4	0,2	4,9	1,6	0,2	0,3
	Min	7,7	7,8	8,6	8,4	96	96	20,1	20,2
	Max	8,1	8,1	9,8	9,0	110	100	20,8	20,9
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
1,26	MW	7,8	8,0	9,1	8,7	102	98	20,4	20,5
	SD	0,1	0,1	0,5	0,2	5,3	1,6	0,2	0,5
	Min	7,6	7,8	8,4	8,4	94	96	20,2	19,8
	Max	8,1	8,1	9,9	9,0	110	100	20,8	21,5
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
4,0	MW	7,8	8,0	9,2	8,7	103	98	20,4	20,6
	SD	0,2	0,1	0,4	0,3	4,7	2,0	0,2	0,6
	Min	7,6	7,8	8,6	8,3	96	95	20,1	19,9
	Max	8,2	8,1	9,8	9,1	109	101	20,6	21,7
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
12,6	MW	7,9	8,0	9,3	8,7	104,4	97,4	20,5	20,6
	SD	0,3	0,1	0,3	0,3	3,7	2,4	0,2	0,4
	Min	7,7	7,8	9	8,3	100	94	20,2	20,0
	Max	8,7	8,1	9,8	9,1	111	101	20,7	21,4
	N	9	9	9	9	9	9	9	9
40	MW	7,9	7,9	9,6	8,3	107	95	20,5	20,6
	SD	0,1	0,1	0,2	0,2	2,4	2,6	0,1	0,5
	Min	7,8	7,9	9,5	8,0	105	92	20,4	20,2
	Max	8,0	8,0	9,8	8,5	110	99	20,7	21,5
	N	4	5	4	5	4	5	4	5

v.: im Test verbrauchte Testlösungen

f.: frische Testlösungen bei Mediumwechsel

Tab. 8.37: Anzahl an von überlebenden Daphnien produzierten Nachkommen jeder Testkonzentration und Kontrolle, die Summe aller Nachkommen einer Testkonzentration (Σ), die daraus errechneten Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD). Werte in Klammern beruhen auf Nachkommen von Daphnien, die nicht bis zum Testende überlebt hatten, und gingen nicht in die Berechnungen der Mittelwerte und die statistischen Auswertungen mit ein.

Replikat	Nominale Konzentration [mg/L]					
	0	0,4	1,26	4,0	12,6	40
1	150	118	114	119	20	(0)
2	128	133	102	92	35	(0)
3	157	135	107	86	(8)	(0)
4	105	103	80	108	(14)	(0)
5	135	104	108	(0)	(30)	(0)
6	161	154	127	95	(27)	(0)
7	108	92	85	54	(27)	(0)
8	112	128	127	110	(1)	(0)
9	121	131	83	82	(23)	(0)
10	99	99	125	79	31	(0)
11	156	120	98	50	57	(0)
12	111	136	93	83	(24)	(0)
Σ	1543	1453	1249	958	143	0
MW	129	121	104	87	36	0
SD	23	18	17	22	16	0

Tab. 8.38: Daphnien-Reproduktionsstudie mit CBZ: Anzahl Nachkommen pro überlebender Daphnie – „Univariate Homogeneity of Variance Tests“ – Cochran's- und Bartlett-Box-Test.

Anzahl Nachkommen pro überlebender Daphnie	
Cochran's C (9,5) = 0,27644	P = 0,877 (approx.)
Bartlett-Box F (4,1845) = 0,34259	P = 0,849 (approx.)

Tab. 8.39: Daphnien-Reproduktionsstudie mit CBZ: Körperlängen der bis Testende überlebenden Daphnien in den Kontrollen und Testkonzentrationen.

Replikat	Nominale Konzentration [mg/L]					
	0	0,4	1,26	4,0	12,6	40 ¹
1	4,31	4,31	4,19	3,50	3,15	-
2	4,31	4,42	4,19	4,00	3,38	-
3	4,31	4,27	4,08	3,85	-	-
4	4,23	4,12	4,12	3,65	-	-
5	4,42	4,08	3,96	-	-	-
6	4,54	4,31	4,38	3,65	-	-
7	4,35	4,19	3,92	3,54	-	-
8	4,42	4,27	4,04	4,12	-	-
9	4,15	4,35	4,04	3,77	-	-
10	4,19	4,15	4,08	3,73	3,19	-
11	4,27	4,08	4,00	3,69	3,46	-
12	4,12	4,15	4,00	3,96	-	-
MW:	4,30	4,22	4,08	3,77	3,30	-
SD:	0,12	0,11	0,13	0,19	0,15	-
N:	12	12	12	11	4	-

¹: keine überlebenden Daphnien in der höchsten Testkonzentration

Tab. 8.40: Daphnien-Reproduktionsstudie mit CBZ: Körperlänge pro überlebender Daphnie – „Univariate Homogeneity of Variance Tests” – Cochran’s-Test und Bartlett-Box-Test.

Körperlänge pro überlebender Daphnie	
Cochran’s C (9,5) = 0,36918	P = 0,170 (approx.)
Bartlett-Box F (4,1845) = 1,04734	P = 0,381 (approx.)

Tab. 8.41: Daphnien-Reproduktionsstudie mit CBZ: Körperlänge pro überlebender Daphnie – Test der Homogenität der Varianzen mittels Levene-Statistik.

	Levene-Statistic	df1	df2	Signifikanz
Körperlänge pro überlebender Daphnie	1,408	4	46	0,246

Tab. 8.42: Daphnien-Reproduktionsstudie mit CBZ: Körperlänge pro überlebender Daphnie – Mehrfachvergleiche nach Dunnett-T-Test (2-seitig).

(I) Konzentration [mg/L]	(J) Konzentration [mg/L]	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
0,4	0,0	-0,0767	0,058	0,505	-0,2235	7,017E-02
1,26	0,0	-0,2183 *	0,058	0,002	-0,3652	-7,1495E-02
4,0	0,0	-0,5326 *	0,059	0,000	-0,6827	-0,3824
12,6	0,0	-1,0067 *	0,082	0,000	-1,2143	-0,7990

*: Die mittlere Differenz ist auf der Stufe 0,05 signifikant.

Tab. 8.43: Daphnien-Reproduktionsstudie mit CBZ: Probit-Analyse – Mortalität: „Observed and Expected Frequencies“.

In concentration [mg/L]	Number of subjects	Observed responses	Expected Responses	Residual	Probability
-4,61	12	0	0	0	0
-0,92	12	0	0	0	0
0,26	12	0	0,004	-0,004	0,00037
1,39	12	1	0,87	0,13	0,07246
2,53	12	8	8,284	-0,284	0,69034
3,69	12	12	11,918	0,082	0,99314

Tab. 8.44: Daphnien-Reproduktionsstudie mit CBZ: Probit-Analyse – Mortalität: Konfidenzintervalle der Effektkonzentrationen.

Wahrscheinlichkeit	Nominale Konzentration [mg/L]	95%-Konfidenzintervall	
		Untergrenze	Obergrenze
0,10	4,436	1,643	6,560
0,20	5,743	2,736	8,159
0,50	9,412	6,295	14,277
0,70	12,806	9,071	23,601
0,90	19,973	13,407	55,904

Tab. 8.45: Sediment-Toxizitätsstudie mit EE2: Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Temperatur im überstehenden Wasser der Testgefäße während des Testzeitraums.

Parameter	Nominale Konzentration [mg/kg]	Code	Expositionszeitpunkt [d]									
			0	1	4	8	12	15	18	21	25	28
O ₂ [%]	0	C0	100	95	93	87	90	98	96	96	91	97
	0	SC ¹	100	n. b.	83	87	90	97	96	96	93	97
	1,0	C1	99	n. b.	89	86	89	97	96	96	94	97
	3,16	C2	98	94	85	87	89	96	95	97	93	96
	10	C3	97	n. b.	82	87	87	95	94	95	93	95
	31,6	C4	97	n. b.	89	86	89	95	100	96	93	97
	100	C5	98	94	90	83	89	97	95	97	94	97
O ₂ [mg/L]	0	C0	9,2	8,9	8,7	8,0	8,1	8,9	9,0	9,0	8,6	9,2
	0	SC ¹	9,3	n. b.	7,9	8,0	8,1	8,7	8,9	9,0	8,8	9,2
	1,0	C1	9,1	n. b.	8,3	7,9	8,1	8,8	8,9	9,0	8,9	9,1
	3,16	C2	8,9	8,8	7,9	8,0	8,0	8,6	8,8	9,1	8,8	9,0
	10	C3	9,0	n. b.	7,6	7,8	7,8	8,6	8,7	8,9	8,8	9,0
	31,6	C4	8,9	n. b.	8,3	7,9	8,0	8,5	9,3	9,0	8,8	9,1
	100	C5	9,1	8,8	8,4	7,7	8,1	8,7	8,8	9,1	8,9	9,1
pH	0	C0	8,2	8,1	8,0	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1	7,7	7,7
	0	SC ¹	8,2	n. b.	7,9	8,1	8,2	8,1	8,2	8,2	8,1	8,2
	1,0	C1	8,2	n. b.	7,9	8,0	8,1	8,0	8,1	8,1	7,9	8,0
	3,16	C2	8,1	8,0	7,9	8,1	8,1	8,0	8,1	8,1	8,0	8,1
	10	C3	8,2	n. b.	7,8	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1	8,0	8,0
	31,6	C4	8,1	n. b.	8,0	8,1	8,1	8,1	8,2	8,1	8,0	8,1
	100	C5	8,1	8,0	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1	8,1	8,0	8,1
Temp. [°C]	0	C0	19,2	19,1	19,1	19,8	19,4	19,0	18,9	19,0	18,6	18,8
	0	SC ¹	19,3	n. b.	19,2	19,5	19,0	19,0	19,0	18,9	18,5	19,0
	1,0	C1	19,3	n. b.	19,4	19,5	19,1	19,1	19,0	19,0	18,5	18,9
	3,16	C2	19,4	19,4	19,4	19,6	19,1	19,2	19,0	18,9	18,6	19,0
	10	C3	19,3	n. b.	19,5	19,6	19,0	19,0	19,2	19,2	18,7	19,1
	31,6	C4	19,5	n. b.	19,4	19,6	19,1	19,3	19,0	18,9	18,6	19,1
	100	C5	19,2	19,2	19,5	19,4	18,8	19,0	19,1	19,0	18,5	19,0

n. b.: nicht bestimmt

¹: Lösungsmittelkontrolle (*solvent control*)

Tab. 8.46: Sediment-Toxizitätsstudie mit AHTN: Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Temperatur im überstehenden Wasser in jeweils einem Replikat pro Konzentrationsstufe während des Testzeitraums.

Parameter	Nominale Konzentration [mg/kg]	Code	Expositionszeitpunkt [d]								
			0 ¹	3	7	10	14	17	21	23	28 ¹
O ₂ [%]	0	C0	92	82	91	89	91	87	96	92	87
	0	SC ²	93	92	92	92	94	95	94	88	91
	6,25	C1	94	90	92	91	91	94	93	87	93
	12	C2	89	91	90	91	92	91	91	89	88
	25	C3	90	91	91	92	90	92	94	94	93
	50	C4	88	90	89	89	92	90	95	91	91
	100	C5	89	90	91	91	92	95	93	88	93
O ₂ [mg/L]	0	C0	8,3	7,2	8,2	8,1	8,1	7,6	8,6	8,1	7,8
	0	SC ²	8,4	8,0	8,3	8,3	8,3	8,2	8,4	7,8	8,1
	6,25	C1	8,5	7,8	8,3	8,3	8,1	8,2	8,2	7,8	8,3
	12	C2	8,1	7,8	8,2	8,2	8,1	8,0	8,1	7,9	7,7
	25	C3	8,2	7,9	8,2	8,3	8,0	8,1	8,3	8,4	8,3
	50	C4	7,9	7,9	8,1	8,0	8,2	7,9	8,4	8,1	8,1
	100	C5	8,1	7,8	8,2	8,2	8,2	8,3	8,3	7,8	8,3
pH	0	C0	7,9	7,7	7,9	7,8	7,8	7,3	7,4	7,4	7,0
	0	SC ²	7,8	7,9	8,1	8,0	8,0	8,0	7,9	7,4	6,6
	6,25	C1	7,9	7,9	8,0	7,9	7,9	7,9	7,9	7,5	6,6
	12	C2	7,8	7,8	8,0	7,9	7,8	7,8	7,9	7,8	7,6
	25	C3	7,9	7,9	8,0	7,9	7,9	7,9	5,8	6,2	6,8
	50	C4	7,8	7,9	8,0	7,9	7,9	7,8	8,0	7,8	7,4
	100	C5	7,8	7,9	8,1	8,0	8,0	8,1	8,0	7,6	6,6
Temp. [°C]	0	C0	20,8	21,6	20,1	20,2	21,2	21,7	21,7	21,6	21,7
	0	SC ²	20,9	21,6	20,0	20,1	21,3	21,7	21,7	21,6	21,7
	6,25	C1	20,8	21,6	20,1	20,2	21,3	21,7	21,7	21,5	21,5
	12	C2	20,8	21,6	20,0	20,1	21,3	21,7	21,7	21,5	21,4
	25	C3	20,8	21,6	20,1	20,2	21,3	21,7	21,7	21,6	21,4
	50	C4	20,8	21,6	20,0	20,1	21,1	21,7	21,6	21,6	21,4
	100	C5	20,9	21,6	20,0	20,1	21,2	21,7	21,7	21,6	21,4

¹: Die Werte der Zeitpunkte 0 d und 28 d bestehen jeweils aus Mittelwerten aller Replikate einer Konzentrationsstufe; ²: Lösungsmittelkontrolle (*solvent control*)

Tab. 8.47: Analyseergebnisse der EE2-Konzentrationen im überstehenden Wasser und Porenwasser während des Sediment-Toxizitätstests mit *Lumbriculus variegatus*.

Probenahmezeitpunkt [d]	Medium	Nominale Testkonzentration [mg/kg Sediment TG]	Gemessene Konzentration [µg/L]
0	überstehendes Wasser	0	n. a.
0		1	4
0		10	129
0		100	n. a.
0	Porenwasser	0	0
0		1	109
0		10	10
0		100	1167
28	überstehendes Wasser	0	0
28		1	1
28		10	22
28		100	653

n. a. = nicht auswertbar; Bestimmungsgrenze (BG): 0,5 ng/L

Tab. 8.48: Sediment-Toxizitätstest mit EE2: Mehrfachvergleich der vereinten Kontrollen (*pooled control*) mit den Testkonzentrationen nach Dunnetts T-Test; *Originaltabelle* aus ToxRat Professional Version 2.07 (ToxRat Solutions GmbH, 2003): *Multiple comparison between treatments and "Pooled Controls" by the t test procedure after Dunnett. Significance was Alpha = 0.05, one-sided smaller (multiple level); Mean: arithmetic mean; n: sample size; s: standard deviation; %LSD: least significant difference to Pooled Controls(in percent of Pooled Controls); t: sample t; t*: critical t for Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$; the differences are significant in case $|t| > |t^*|$ (The residual variance of an ANOVA was applied; $df = N - k$; N: sum of treatment replicates $n(i)$; k: number of treatments).*

Biologischer Parameter	Treatment [mg/kg]	Mean	s	df	%LSD	t	t*	Significance
Anzahl Würmer pro Replikat	<i>Pooled Control</i>	22.8	2.44	22				
	1.0	28.3	2.44	22	16.4	3.68	-2.49	-
	3.16	26.3	2.44	22	16.4	2.34	-2.49	-
	10	24.8	2.44	22	16.4	1.34	-2.49	-
	31.6	24.5	2.44	22	16.4	1.17	-2.49	-
	100	10.0	2.44	22	16.4	-8.54	-2.49	+
Adulte (ungeteilte) Würmer ¹	<i>Pooled Control</i>	2.8	1.62	22				
	1.0	2.0	1.62	22	89.9	-0.76	2.49	-
	3.16	2.0	1.62	22	89.9	-0.76	2.49	-
	10	2.8	1.62	22	89.9	0.00	2.49	-
	31.6	3.3	1.62	22	89.9	0.50	2.49	-
	100	7.3	1.62	22	89.9	4.54	2.49	+
Würmer mit neuen Enden pro Replikat	<i>Pooled Control</i>	20.0	3.57	22				
	1.0	26.3	3.57	22	27.3	2.86	-2.49	-
	3.16	24.3	3.57	22	27.3	1.94	-2.49	-
	10	22.0	3.57	22	27.3	0.91	-2.49	-
	31.6	21.3	3.57	22	27.3	0.57	-2.49	-
	100	2.8	3.57	22	27.3	-7.88	-2.49	+
Biomasse pro Replikat [mg TG]	<i>Pooled Control</i>	17.8	3.22	22				
	1.0	24.9	3.22	22	27.6	3.58	-2.49	-
	3.16	23.2	3.22	22	27.6	2.71	-2.49	-
	10	22.1	3.22	22	27.6	2.17	-2.49	-
	31.6	23.0	3.22	22	27.6	2.60	-2.49	-
	100	12.0	3.22	22	27.6	-2.96	-2.49	+
Biomasse pro Wurm ¹ [mg TG]	<i>Pooled Control</i>	0.78	0.144	22				
	1.0	0.88	0.144	22	28.1	1.19	2.49	-
	3.16	0.88	0.144	22	28.1	1.19	2.49	-
	10	0.91	0.144	22	28.1	1.45	2.49	-
	31.6	0.95	0.144	22	28.1	1.88	2.49	-
	100	1.19	0.144	22	28.1	4.64	2.49	+

+: significant; -: non-significant

A NOEC of 31.6 mg/kg is suggested by the program.

¹: Die Parameter ‚Adulte (ungeteilte) Würmer‘ und ‚Biomasse pro Wurm‘ wurden *einseitig* >Kontrollen getestet.

Tab. 8.49: Sediment-Toxizitätstest mit AHTN: „Univariate Homogeneity of Variance Tests” – Cochran’s-Test und Bartlett-Box-Test, Vergleich der Testkonzentrationen mit den vereinten Kontrollen (Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen).

Anzahl Würmer pro Replikat	Cochran’s C (4,6) = 0,38756	P = 0,217 (approx.)
	Bartlett-Box F (5,506) = 2,55304	P = 0,027
Anzahl adulte (ungeteilte) Würmer pro Replikat	Cochran’s C (4,6) = 0,36138	P = 0,312 (approx.)
	Bartlett-Box F (5,506) = 1,06825	P = 0,377
Anzahl Würmer mit neuen Enden pro Replikat	Cochran’s C (4,6) = 0,34076	P = 0,410 (approx.)
	Bartlett-Box F (5,506) = 0,83519	P = 0,525
Wurmbiomasse pro Replikat	Cochran’s C (4,6) = 0,25671	P = 1,000 (approx.)
	Bartlett-Box F (5,506) = 1,19426	P = 0,311
Biomasse pro Wurm	Cochran’s C (4,6) = 0,33065	P = 0,466 (approx.)
	Bartlett-Box F (5,506) = 0,56650	P = 0,726

Tab. 8.50: Sediment-Toxizitätsstudie mit AHTN: Mehrfachvergleiche nach Dunnett-T-Test (einseitig); Vergleich der Testkonzentrationen mit den vereinten Kontrollen (Kontrollen und Lösungsmittelkontrollen).

Biologischer Parameter	(I) Konzentration [mg/kg]	(J) Konzentration [mg/kg]	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Anzahl Würmer pro Replikat	6,25	0,0	-2,750	2,1223	0,338	-	2,4070
	12,5	0,0	3,250	2,1223	0,999	-	8,4070
	25	0,0	-1,500	2,1223	0,618	-	3,6570
	50	0,0	-1,250	2,1223	0,673	-	3,9070
	100	0,0	-8,500 *	2,1223	0,001	-	-3,3430
Adulte (ungeteilte) Würmer	6,25	0,0	-1,500	0,6561	1,000	-3,0941	-
	12,5	0,0	-1,500	0,6561	1,000	-3,0941	-
	25	0,0	-3,000	0,6561	1,000	-4,5941	-
	50	0,0	-2,000	0,6561	1,000	-3,5941	-
	100	0,0	5,500 *	0,6561	0,000	3,9059	-
Würmer mit neuen Enden pro Replikat	6,25	0,0	-1,250	2,0142	0,658	-	3,6441
	12,5	0,0	4,750	2,0142	1,000	-	9,6441
	25	0,0	1,500	2,0142	0,984	-	6,3941
	50	0,0	,750	2,0142	0,954	-	5,6441
	100	0,0	-14,000 *	2,0142	0,000	-	-9,1059
Biomasse pro Replikat [mg TG]	6,25	0,0	-4,863	3,1341	0,237	-	2,7528
	12,5	0,0	7,538	3,1341	1,000	-	15,1528
	25	0,0	-3,813	3,1341	0,373	-	3,8028
	50	0,0	-2,488	3,1341	0,576	-	5,1278
	100	0,0	-12,263 *	3,1341	0,002	-	-4,6472
Biomasse pro Wurm [mg TG]	6,25	0,0	-0,150	0,1090	0,304	-	0,1149
	12,5	0,0	0,218	0,1090	1,000	-	0,4824
	25	0,0	-0,133	0,1090	0,373	-	0,1324
	50	0,0	-0,073	0,1090	0,638	-	0,1924
	100	0,0	-0,393 *	0,1090	0,004	-	-0,1276

*: Die mittlere Differenz ist auf der Stufe 0,05 signifikant.

Tab. 8.51: Sediment-Toxizitätstest mit AHTN: „Univariate Homogeneity of Variance Tests” – Cochran’s-Test und Bartlett-Box-Test; Vergleich der Testkonzentrationen mit den Lösungsmittelkontrollen.

Anzahl Würmer pro Replik	Cochran’s C (3,6) = 0,57773	P = 0,024 (approx.)
	Bartlett-Box F (5,417) = 2,24131	P = 0,049
Anzahl adulte (ungeteilte) Würmer pro Replik	Cochran’s C (3,6) = 0,42857	P = 0,206 (approx.)
	Bartlett-Box F (5,417) = 0,92379	P = 0,465
Anzahl Würmer mit neuen Enden pro Replik	Cochran’s C (3,6) = 0,45648	P = 0,145 (approx.)
	Bartlett-Box F (5,417) = 1,04446	P = 0,391
Wurmbiomasse pro Replik	Cochran’s C (3,6) = 0,28190	P = 0,978 (approx.)
	Bartlett-Box F (5,417) = 1,06201	P = 0,381
Biomasse pro Wurm	Cochran’s C (3,6) = 0,29507	P = 0,865 (approx.)
	Bartlett-Box F (5,417) = 0,70125	P = 0,623

Tab. 8.52: Sediment-Toxizitätsstudie mit AHTN: Mehrfachvergleiche nach Dunnett-T-Test (einseitig); Vergleich der Testkonzentrationen mit den Lösungsmittelkontrollen.

Biologischer Parameter	(I) Konzentration [mg/kg]	(J) Konzentration [mg/kg]	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Anzahl Würmer pro Replik	6,25	0,0	1,000	1,8181	0,946	-	5,3764
	12,5	0,0	7,000	1,8181	1,000	-	11,3764
	25	0,0	2,250	1,8181	0,991	-	6,6264
	50	0,0	2,500	1,8181	0,994	-	6,8764
	100	0,0	-4,750 *	1,8181	0,034	-	-0,3736
Adulte (ungeteilte) Würmer	6,25	0,0	-0,750	0,6614	0,988	-2,3421	-
	12,5	0,0	-0,750	0,6614	0,988	-2,3421	-
	25	0,0	-2,250	0,6614	1,000	-3,8421	-
	50	0,0	-1,250	0,6614	0,999	-2,8421	-
	100	0,0	6,250 *	0,6614	0,000	4,6579	-
Würmer mit neuen Enden pro Replik	6,25	0,0	1,750	1,8948	0,979	-	6,3110
	12,5	0,0	7,750	1,8948	1,000	-	12,3110
	25	0,0	4,500	1,8948	1,000	-	9,0610
	50	0,0	3,750	1,8948	0,999	-	8,3110
	100	0,0	-11,00 *	1,8948	0,000	-	-6,4390
Biomasse pro Replik [mg TG]	6,25	0,0	-0,900	3,1964	0,737	-	6,7941
	12,5	0,0	11,500	3,1964	1,000	-	19,1941
	25	0,0	0,150	3,1964	0,847	-	7,8441
	50	0,0	1,475	3,1964	0,934	-	9,1691
	100	0,0	-8,300 *	3,1964	0,035	-	-0,6059
Biomasse pro Wurm [mg TG]	6,25	0,0	-0,135	0,1363	0,426	-	0,1931
	12,5	0,0	0,233	0,1363	0,998	-	0,5606
	25	0,0	-0,118	0,1363	0,484	-	0,2106
	50	0,0	-0,058	0,1363	0,681	-	0,2706
	100	0,0	-0,378 *	0,1363	0,025	-	-0,0494

*: Die mittlere Differenz ist auf der Stufe 0,05 signifikant.

Tab. 8.53: Bei der Expositionsabschätzung mit EUSES (EC, 2004) verwendete Werte für verschiedene Parameter und Eigenschaften der Substanzen.

<i>Parameter</i>	CBZ	SMX	EE2	AHTN
<i>Prescription volume of chemical in D {t/a}</i> ¹	87.605	53.6	0.0475	-
<i>Production volume of chemical in EU {t/a}</i>	400	245	0.217	385 ²
<i>Industry category</i>	<i>Personal/domestic use</i>	<i>Personal/domestic use</i>	<i>Personal/domestic use</i>	<i>Personal/domestic use</i>
<i>Use category</i>	<i>Pharmaceutical</i>	<i>Pharmaceutical</i>	<i>Pharmaceutical</i>	<i>Odour agent</i>
<i>Extra details on use category</i>	<i>Oral use</i>	<i>Oral use</i>	<i>Oral use</i>	<i>Cosmetics</i>
<i>Biodegradability</i>	<i>Not biodegradable</i>	<i>Not biodegradable</i>	<i>Not biodegradable</i>	<i>Inherently biodegradable</i>
<i>Fraction connected to sewer systems</i>	0.90	0.90	0.90	0.90
<i>Fraction released to waste water (private use)</i>	0.95	0.95	0.95	0.95

¹: Daten von IMS – Institut für Medizinische Statistik (BLAC, 2003)

²: OSPAR (2000)